

IFW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of
GUILLAUME, et al.

Examiner: Not Yet Known

Group Art Unit.: Not Yet Known

Application No.: **10/823,142**

Filed: **April 13, 2004**

Title: **METHOD FOR OBTAINING
MASTOCYTE LINES FROM PIG
TISSUES AND FOR PRODUCING
HEPARIN-TYPE MOLECULES**

CERTIFICATE OF MAILING (37 CFR 1.8a)

I hereby certify that this paper (along with any referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the: Commissioner for Patents, P. O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Date of Deposit **August 30, 2004**

Jonas Pierre, Sr.

(Type or print name of person mailing paper)

(Signature of person mailing paper)

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P. O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

**SUBMISSION AND REQUEST FOR ENTRY
OF PRIORITY PAPERS 37 C.F.R. § 1.55(a)**

Applicants submit herewith certified copy of French application, 0304671, filed on April 14, 2003, for which priority is claimed in the above-identified application.

This submission and request for entry is being made to satisfy the requirements under 35 U.S.C. § 119. Please note that no fees are associated with the entry of the priority documents since they are being timely submitted prior to the date the issue fee is due.

Respectfully submitted,

Joel B. German, Reg. No., 48,676
Attorney/Agent for Applicant

Aventis Pharmaceuticals Inc.
Patent Department
Route #202-206 / P.O. Box 6800
Bridgewater, New Jersey 08807-0800
Telephone (908) 231-3444
Telefax (908) 231-2626

Aventis Docket No. FRAV2003/0009 US NP

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 MARS 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Important!

Remplir impérativement la 2ème page.

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 190600

14 AVRIL 2003 REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI PARIS B LIEU 0304671 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 14 AVR. 2003 Vos références pour ce dossier (facultatif) FRAV2003/0009		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE AVENTIS PHARMAS.A. Direction brevet - Tri K2/144 20 avenue Raymond Aron 92165 ANTONY CEDEX	
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale N° _____ Date ____/____/____ ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date ____/____/____			
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale N° _____ Date ____/____/____			
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE D'OBTENTION DE LIGNEES DE MASTOCYTES A PARTIR DE TISSUS DE PORCS ET PROCEDE DE PRODUCTION DE MOLECULES DE TYPE HEPARINE.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		AVENTIS PHARMA S.A.	
Prénoms			
Forme juridique		S.A.	
N° SIREN		3 . 0 . 4 . 4 . 6 . 3 . 2 . 8 . 4	
Code APE-NAF		. . .	
Adresse	Rue	20 avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92160	ANTONY
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		01.55.71.71.71	
N° de télécopie (facultatif)		01.55.71.72.91	
Adresse électronique (facultatif)		WWW.AVENTIS.COM	



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 14 AVRIL 2003 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0304671		DB 540 W / 190600	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		FRA V2003/0009	
6 MANDATAIRE			
Nom		BOUVET	
Prénom		Philippe	
Cabinet ou Société		AVENTIS PHARMA S.A.	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		PG11904	
Adresse	Rue	20 avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92165	ANTONY CEDEX
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.55.71.76.92	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.55.71.72.91	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		philippe.bouvet@aventis.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) BOUVET Philippe		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. ROCHET	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Procédé d'obtention de lignées de mastocytes à partir de tissus de porcs et
procédé de production de molécules de type héparine

- 5 La présente demande a pour objet un procédé d'obtention de cultures ou de lignées de mastocytes. Elle est en outre relative à un procédé de production de molécules de type héparine comprenant la mise en culture de cultures ou lignées de mastocytes.
- 10 Les mastocytes sont des cellules du système immunitaire, dérivés de précurseurs hématopoïétiques, qui interviennent dans la réponse inflammatoire, notamment dans les phénomènes d'allergie et d'hypersensibilité. Ils sont localisés dans le tissu conjonctif, notamment au niveau de la peau, des muqueuses intestinales et respiratoires.
- 15 Les mastocytes se présentent sous la forme de cellules arrondies d'un diamètre compris entre environ 5 à 25µm et possèdent un noyau arrondi, unique, central ou excentré. Ils sont aussi caractérisés par la présence de nombreuses granulations cytoplasmiques méta-chromatiques.
- 20 Ces granules renferment diverses espèces moléculaires ayant une activité pro-inflammatoire telles que l'histamine, la sérotonine, des protéoglycanes tels que l'héparine ou le chondroïtine sulfate, des enzymes, des cytokines et des facteurs chimioattractants des éosinophiles et des neutrophiles. Ces espèces sont libérées lors de l'activation mastocytaire.
- 25 Après activation, une réponse secondaire se met en place durant laquelle a lieu la synthèse des médiateurs tels que les leucotriènes, les prostaglandines, le PAF (platelet activating factor), des interleukines (IL4, IL5, IL6, IL10, IL12 et IL 13), des cytokines (TGF beta, IFN gamma, GM-CSF) et des chimiokines (MCP-1, IL8, RANTES).
- 30 L'ensemble de ces espèces participe au déclenchement d'un processus inflammatoire et à la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique dépendante des lymphocytes T.
- 35 Des cultures de mastocytes ont été déjà obtenues chez l'homme et la souris, mais l'état de la technique ne fournit pas de description de telles cultures établies ou de lignées chez le porc.
- Razin et al (J. Biol. Chem., 257, 7229-7236, 1982) décrivent l'obtention de mastocytes de souris en utilisant des milieux de culture contenant de l'IL3.
- 40 Wang et al (Circ. Res., 84, 74-83, 1999) décrivent l'isolement de mastocytes séreux obtenus à partir de cavités pleurales et péritonéales de rat. Diverses espèces moléculaires sont produites mais uniquement quand les mastocytes sont co-cultivés avec des cellules de muscle lisse aortique de rat. La demande WO99/26983 décrit des travaux proches, et est très peu précise quant à l'application à d'autres espèces.
- 45 Des lignées cellulaires ont été établies chez la souris (Montgomery et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 11327-11331, 1992 et demande WO90/14418) mais à partir de mastocytomes. Ces tumeurs sont extrêmement rares chez le porc.

- Chez l'homme l'obtention de cultures de mastocytes s'est révélée difficile. Elle a tout d'abord été permise par l'utilisation de système de co-culture avec des fibroblastes (Ishizaka et al, Current Opinion in Immunology, 5, 937-943, 1993). D'autres auteurs sont ensuite parvenus à obtenir des mastocytes à partir de cellules intestinales et à maintenir ces cellules en culture pendant environ 6 mois en présence de SCF (Bischoff et al, J. Immunol., 159, 5560-5567, 1997). Quant elle a été mesurée, les auteurs de ces différents articles n'ont reporté qu'une faible production de composés de type héparine.
- Chez le porc Emery et al (Experimental Hematology, 24, 927-935, 1996) ont maintenu, durant 7 semaines, des cultures de cellules obtenues à partir de moelle osseuse. Néanmoins il apparaît que les cultures obtenues sont des mélanges de divers types cellulaires et non des cultures homogènes ou des lignées de mastocytes. De plus ces cultures contiennent des cellules non-différenciées en cultures homogènes de mastocytes.
- Ashraf et al (Veterinary Parasitology; 29, 134-158, 1988) ont isolé des mastocytes de porcs à partir de la muqueuse intestinale sans maintenir de cultures amplifiables. En outre la caractérisation des mastocytes isolés révèle l'absence d'héparine.
- L'héparine appartient à la famille des glycosaminoglycanes (GAG), qui regroupe les polysaccharides linéaires contenant une répétition d'une séquence disaccharidique se composant d'un sucre aminé (D-glucosamine ou galactosamine) et d'un acide uronique (D-glucuronique ou L-iduronique).
- Dans le cas de l'héparine, qui appartient, avec l'héparane sulfate, à la sous-famille des glucosaminoglycanes le sucre aminé est la D-glucosamine. L'acide uronique est soit l'acide glucuronique (Glc), soit l'acide iduronique (Ido). La glucosamine peut être N-acétylée, N-sulfatée et O-sulfatée.
- Conventionnellement, on désigne sous le terme "héparine" des polysaccharides hautement sulfatés dans lesquels plus de 80% des résidus glucosamine sont N-sulfatés et le nombre de O-sulfate est plus important que celui des N-sulfates. Le rapport sulfate/carboxylate est généralement supérieur à 2 pour l'héparine. Cependant, la structure de l'héparine est en fait très hétérogène, et il existe des chaînes pouvant contenir des rapports très différents.
- Comme tous les GAGs, l'héparine est synthétisée sous forme d'un protéoglycane essentiellement par les mastocytes.
- La première étape de la synthèse de l'héparine est la formation du noyau protéique serglycine, constitué d'une répétition de résidus sérine et glycine.
- L'élongation de la chaîne d'héparine se fait par ajout d'un tétrasaccharide, puis par ajouts successifs de glucosamines et d'acides uroniques, régulièrement alternés.
- Le protéoglycane ainsi formé subit de nombreuses transformations séquentielles: N-déacétylation, N-sulfatation, épimérisation de l'acide D-glucuronique, et O-sulfatation.
- Toutefois, cette maturation complète n'a lieu que sur une partie du protéoglycane, ce qui génère une grande variabilité structurale de l'héparine, responsable de son hétérogénéité.
- Les chaînes de polysaccharides sont ensuite clivées de la serglycine par une

endoglucuronidase. Ces chaînes ont alors un poids moléculaire entre 5000 et 30.000 Da. Elles forment des complexes avec les protéases basiques et sont ainsi stockées dans les granules des mastocytes. L'héparine est excrétée uniquement lors de la dégranulation des mastocytes.

- 5 L'héparine joue un rôle biologique important, notamment dans l'hémostase, et est très largement utilisée en thérapeutique, en particulier en tant qu'agent anticoagulant et antithrombotique.

10 La majeure partie de l'héparine utilisée est isolée à partir de la muqueuse intestinale du porc, d'où elle est extraite par protéolyse, suivie de purification sur résine échangeuse d'anions (pour revue sur les différents procédés de préparation de l'héparine, cf. DUCLOS, « L'Héparine : fabrication, structure, propriétés, analyse »; Ed. Masson, Paris, 1984).

15 L'analyse de la composition en disaccharides de l'héparine de porc après dépolymérisation et chromatographie permet de différencier l'héparine des autres glycosaminoglycanes. On distingue notamment huit principaux disaccharides (figure 6). Les disaccharides sulfatés, Is, IIs, IIIs, IVs, sont proportionnellement les plus abondants avec majoritairement le Is dont la quantité est supérieure à 40%,
20 et préférentiellement supérieure à 50%. Par ordre d'abondance viennent ensuite les disaccharides IIs, IIIs et IVs. Le ratio entre les disaccharides Is et IIs est compris entre 3 et 8.

25 On peut observer une hétérogénéité dans la composition de l'héparine entre les lots issus de lots d'animaux d'origines différentes. Cette hétérogénéité est susceptible d'engendrer des variabilités dans l'activité biologique.

De plus l'utilisation d'animaux comme source d'héparine constitue un risque du fait de la présence éventuelle de virus susceptibles d'être transmis à l'homme.

En outre, l'approvisionnement en matière première peut se révéler irrégulier.

30 La présente invention propose de pallier ces inconvénients et de s'affranchir des problèmes d'approvisionnement en termes de quantité et de qualité, en utilisant une source de matière première plus facilement contrôlable.

35 La demanderesse a montré qu'il était possible de produire en quantité importante à partir de cultures de mastocytes, de l'héparine possédant des propriétés comparables à celles de l'héparine extraite du mucus intestinal porcin et reproductibles.

40 La demanderesse a en outre mis en évidence que les gènes codant trois protéines d'importance pour la production de molécules de type héparine ou l'indépendance des mastocytes vis à vis de facteurs de croissance, présentaient chez le porc des séquences différentes de celles d'autres espèces.

45 La présente invention a pour objet un procédé d'obtention de cultures ou de lignées de mastocytes comprenant la mise en culture d'une population de cellules souches de moelle osseuse de jeunes porcs ou de fœtus, dans un milieu comprenant au moins environ 0,2 ng/ml d'interleukine- 3 (IL-3) préférentiellement porcine (préférentiellement au moins 0,5 ng/ml, encore plus préférentiellement au moins 2 ng/ml), au moins environ 8 ng/ml de Stem Cell Factor (SCF) préférentiellement porcin (préférentiellement au moins 20 ng/ml, encore plus

préférentiellement au moins 80 ng/ml) et au moins environ 0,1 ng/ml d'interleukine-4 (IL-4) préférentiellement porcine (préférentiellement au moins 0,5 ng/ml, encore plus préférentiellement au moins 1 ng/ml), 10 ng/ml d'interleukine-6 (IL-6) préférentiellement porcine (préférentiellement au moins 50 ng/ml, encore plus préférentiellement au moins 100 ng/ml) et/ou 1 ng/ml de G-CSF préférentiellement porcin (préférentiellement au moins 5 ng/ml, encore plus préférentiellement au moins 10 ng/ml).

Ainsi le milieu d'obtention contient une combinaison d'IL4, d'IL6 et de G-CSF séparément, deux à deux ou tous les trois ensemble dans un milieu contenant de l'IL3 et du SCF.

Bien que ces différents facteurs soient préférentiellement d'origine porcine, c'est à dire que leur séquence est déduite de celle du facteur correspondant chez le porc, il est possible de remplacer au moins l'un d'entre eux par un facteur d'une autre origine.

Ainsi l'interleukine 4 (IL-4) bien que préférentiellement d'origine porcine, peut aussi être d'origine murine ou humaine.

Selon un mode de mise en œuvre de ce procédé les porcs dont sont issues les cellules souches ont entre environ 2 jours et environ 6 semaines. Néanmoins le procédé peut être appliqué à des cellules issues d'embryons ou de porcs plus âgés.

De manière avantageuse les cellules sont maintenues dans le milieu pendant au moins environ 30 jours.

La présente invention a en outre pour objet des cultures et des lignées de mastocytes porcins susceptibles d'être obtenues par ledit procédé.

On entend par mastocytes des cellules qui, entre autres caractéristiques, présentent des granules cytoplasmiques métachromatiques contenant des molécules de type héparine et des protéases telles que de la tryptase, et expriment à leurs surfaces des récepteurs tels que le récepteur au SCF nommé c-kit ou encore le récepteur des IgE.

Le terme « culture » désigne ici, de manière générale, une cellule ou un ensemble de cellules cultivées *in vitro*. Une culture développée directement à partir d'un prélèvement cellulaire ou tissulaire effectué sur un animal est dénommée « culture primaire ».

Le terme « lignée » est employé à partir du moment où au moins un passage, et généralement plusieurs passages consécutifs en sous-culture ont été effectués avec succès, et désigne toute culture qui en est issue (SCHAEFFER, *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 26, 91-101, 1990).

La présente invention a en outre pour objet des cultures ou lignées de mastocytes porcins caractérisées en ce qu'elles produisent des molécules de type héparine présentant un rapport entre les disaccharides IIs et IIIs proche de celui de l'héparine porcine.

On entend par molécules de type héparine des polysaccharides hautement sulfatés dans lesquels plus de 80% des résidus glucosamine sont N-sulfatés et le nombre de O-sulfate est plus important que celui des N-sulfates.

De manière avantageuse de telles cultures ou lignées produisent des molécules de type héparine présentant un rapport entre les disaccharides IIs et IIIs compris entre 0,5 et 5 (préférentiellement entre 1 et 2,5, encore plus préférentiellement entre 1,3 et 1,9) et/ou des molécules de type héparine présentant un rapport entre les disaccharides Is et IIs compris entre environ 3 et 8 (préférentiellement entre 4 et 7 encore plus préférentiellement entre 5 et 7).

Des cultures établies ou lignées de mastocytes porcins selon la présente invention peuvent aussi être caractérisées en ce qu'elles produisent, au moins 0,1 µg de molécules de type héparine/10⁶ cellules (préférentiellement au moins 1 µg, encore plus préférentiellement au moins 10 µg).

De manière avantageuse de telles cultures ou lignées produisent des molécules de type héparine dans lesquelles les quantités en disaccharides Is sont supérieures aux quantités en disaccharides IIs, les quantités en disaccharides IIs sont supérieures aux quantités en disaccharides IIIs, et les quantités en disaccharides IIIs sont supérieures aux quantités en disaccharides IVs,

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de telles cultures ou lignées produisent des molécules de type héparine présentant des rapports entre les disaccharides Is, IIs, IIIs et IVs proches de ceux de l'héparine.

De manière avantageuse de telles cultures ou lignées produisent des molécules de type héparine comprenant au moins 30% de disaccharides Is (préférentiellement au moins 40%, encore plus préférentiellement au moins 50%). De manière avantageuse de telles cultures ou lignées produisent, des molécules de type héparine présentant une activité anti-Xa supérieure à au moins 10 UI/mg (préférentiellement au moins 20 UI/mg) et/ou présentant une activité anti-IIa supérieure à au moins 10 UI/mg (préférentiellement au moins 20 UI/mg).

Selon un mode de mise en œuvre préférentiel de l'invention de telles lignées sont les lignées de mastocytes porcins déposées auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur (CNCM) 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France, le 09 Avril 2003 respectivement sous les n° I-3010, I-3011, I-3012, I-3013, I-3014.

Ces lignées, déposées auprès de la CNCM, présentent l'avantage d'avoir été obtenues à partir de porcs répondant à des exigences sanitaires en adéquation avec un usage des produits dérivés de leurs cellules en thérapeutique humaine. Ces porcs sont issus d'élevages protégés, indemnes d'organismes pathogènes spécifiques (IOPS) du porc.

Des acides nucléiques, comprenant des gènes codant pour des facteurs susceptibles d'améliorer les caractéristiques des cultures et lignées selon la présente invention peuvent être introduits dans ces cellules. Le terme acide nucléique est employé pour désigner un ADN ou un ARN. Avantageusement il est un ADN complémentaire ou génomique.



De tels facteurs peuvent permettre soit de favoriser la croissance des cellules soit de moduler la composition des molécules biologiques qu'elles produisent, et en particulier la composition des molécules de type héparine.

5 Ils peuvent être des gènes codants pour des protéines immortalisantes telles que l'antigène T du virus simien 40 (SV40), les protéine E6 et E7 du virus humain papilloma HPV, les protéines E1A de l'adénovirus, les protéines EBNA2 du virus d'Epstein-Barr ou encore les protéines Tax du virus HTLV-1. L'acide nucléique codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase, TERT, peut aussi être
10 utilisé comme gène immortalisant.

On utilisera préférentiellement l'AgT du virus SV-40, la séquence de l'ADN complémentaire de cet antigène est disponible dans GenBank sous la référence NC_001669..

15 Ils peuvent encore être des gènes codant pour des protéines permettant aux cellules de proliférer comme par exemple le G-CSF, le SCF et les interleukines (IL-3, IL-4 et IL-6).

Récemment, l'étude de mastocytomes murin et humain a permis d'identifier des
20 mutations ou délétions du gène c-kit responsables de l'activation constitutive du récepteur c-kit. L'expression du gène c-kit muté au niveau du V814 dans des mastocytes immatures IC2 induit la transformation de ces cellules à savoir l'acquisition d'une croissance indépendante du SCF et d'un potentiel tumorigène (Pia et al, Blood, 87(8), 3117-3123, 1996). Un acide nucléique comprenant un tel
25 gène muté peut être introduit dans ces cellules.

Ils peuvent être des gènes codant pour des protéines comme la ser/gly ou des enzymes agissant sur la sulfatation des molécules de type héparine. Une telle enzyme peut être une O-sulfatase, telle qu'une 3-O-sulfatase. ou encore une 6-O
30 sulfatase.

Avantageusement une telle enzyme est la 3 O-sulfatase-1 (3-OST-1), préférentiellement la 3 O-sulfatase-1 porcine.

35 Les acides nucléiques comprenant ces gènes peuvent être introduits dans ces cellules par toute méthode connue de l'homme du métier et en particulier par transfection, par nucléoporation ou par électroporation. Des vecteurs rétroviraux portant ces gènes peuvent aussi être utilisés pour transfecter ces cellules.

40 Dans le cadre de la présente invention la demanderesse a mis en évidence que l'introduction d'un acide nucléique codant une 3-OST, et en particulier la 3-OST-1, permet de moduler la composition des molécules de type héparine des mastocytes, quel que soit le type de mastocyte d'origine porcine.

La demanderesse n'entend donc pas limiter cet objet de son invention aux mastocytes obtenus par le procédé décrit ci dessus. Aussi la présente demande a
45 pour objet tout mastocyte d'origine porcine dans lequel un acide nucléique codant une 3-OSTa été introduit.

La demanderesse a en outre déterminé les séquences de trois protéines d'origine porcine pouvant être utilisées pour la mise en œuvre de la présente invention et des séquences nucléotidiques codant ces protéines.

- 5 Ainsi la présente demande a pour objet une protéine d'origine porcine de type c-kit caractérisée en ce qu'elle présente une extrémité C-terminale ayant la séquence SEQ ID N°3. Une telle protéine peut comprendre une séquence présentant une identité d'au moins 99% avec la séquence SEQ ID N°2. De manière préférentielle une telle protéine présente une glutamine (Q) en position 40 et/ou une lysine (K) en position 173. La présente invention a en outre pour objet un polynucléotide ou un acide nucléique, comprenant une séquence codant une protéine d'origine porcine de type c-kit. Un tel acide nucléique peut comprendre une séquence présentant une identité d'au moins 99% avec la séquence SEQ ID N°1. L'obtention de la séquence complète du c-kit porcin n'était pas évidente au vu de l'état de la technique.

- La présente demande a de plus pour objet une protéine d'origine porcine présentant une activité 3 -O-sulfatase. Une telle protéine peut comprendre une séquence présentant une identité d'au moins 95%, préférentiellement d'au moins 97%, et encore plus préférentiellement d'au moins 99%, d'identité en acides aminés avec une protéine de séquence SEQ ID N°5.

- La présente invention a en outre pour objet un polynucléotide ou un acide nucléique, comprenant une séquence codant une protéine d'origine porcine présentant une activité 3-OST. Un tel acide nucléique peut comprendre une séquence présentant une identité d'au moins 95%, préférentiellement d'au moins 97%, et encore plus préférentiellement d'au moins 99%, d'identité en nucléotides avec un acide nucléique de séquence SEQ ID N°4. L'obtention de la séquence de la 3-OST porcine n'était pas évidente au vu de l'état de la technique. La 3-OST porcine isolée est susceptible de présenter des propriétés inattendues, et en particulier de présenter une meilleure activité dans les mastocytes porcins par rapport aux 3-OST d'autres espèces connues de l'homme du métier.

- 35 La présente demande a encore pour objet une protéine d'origine porcine présentant une activité 6-O-sulfatase. Une telle protéine peut comprendre une séquence présentant une identité d'au moins 90%, préférentiellement d'au moins 95%, et encore plus préférentiellement d'au moins 99%, d'identité en acides aminés avec une protéine de séquence SEQ ID N°7. La présente invention a en outre pour objet un polynucléotide ou un acide nucléique, comprenant une séquence codant une protéine d'origine porcine présentant une activité 6-OST. Un tel acide nucléique peut comprendre une séquence présentant une identité d'au moins 95% préférentiellement d'au moins 97%, et encore plus préférentiellement d'au moins 99%, d'identité en nucléotides avec un acide nucléique de séquence SEQ ID N°6. L'obtention de la séquence de la 6-OST porcine n'était pas évidente au vu de l'état de la technique. La 6-OST porcine isolée est susceptible de présenter des propriétés inattendues, et en particulier de présenter une meilleure activité dans

les mastocytes porcins par rapport aux 3-OST d'autres espèces connues de l'homme du métier

5 En outre la présente demande a pour objet des acides nucléiques s'hybridant en conditions de forte stringence avec un acide nucléique de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°4 ou de séquence SEQ ID N°6.

10 Le « pourcentage d'identité » entre deux séquences de nucléotides ou d'acides aminés, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison. La partie de la séquence nucléotidique ou polypeptide dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal des deux

15 séquences.

Le pourcentage est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles une base nucléique ou un résidu d'acide aminé identique est observé pour les deux séquences (nucléique ou peptidique) comparées, puis en divisant le nombre de

20 positions auquel il y a identité entre les deux bases ou résidus d'acides aminés par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par 100 afin d'obtenir le pourcentage d'identité de séquence.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de

25 manière informatique à l'aide d'algorithmes connus contenus dans le package de la Société WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison, WISCONSIN.

A titre d'illustration, le pourcentage d'identité de séquence pourra être effectué à l'aide du logiciel BLAST (versions BLAST 1.4.9 de mars 1996, BLAST 2.0.4 de

30 février 1998 et BLAST 2.0.6 de septembre 1998), en utilisant exclusivement les paramètres par défaut (S. F Altschul et al, J. Mol. Biol. 1990 215 : 403-410, S. F Altschul et al, Nucleic Acids Res. 1997 25 : 3389-3402). Blast recherche des séquences similaires/homologues à une séquence « requête » de référence, à l'aide de l'algorithme d'Altschul et al. La séquence requête et les bases de

35 données utilisées peuvent être peptidiques ou nucléiques, toute combinaison étant possible.

Par « conditions d'hybridation de forte stringence » au sens de la présente invention, on entendra les conditions suivantes :

40 1- Pré-hybridation des membranes et:

- Mélanger : 40 µl ADN sperme de saumon (10mg/ml) + 40 µl ADN placentaire humain (10mg/ml)
- Dénaturer 5 mn à 96°C, puis plonger dans la glace le mélange.
- Oter le SSC 2X et verser 4 ml de mix formamide dans le tube d'hybridation
- 45 contenant les membranes.
- Ajouter le mélange des deux ADNs dénaturés.
- Incubation à 42°C pendant 5 à 6 heures, avec rotation.

2- Compétition de la sonde marquée :

- Ajouter à la sonde marquée et purifiée 10 à 50 µl ADN Cot I, selon la quantité de répétitions.

- Dénaturer 7 à 10 mn à 95°C.

- Incuber à 65°C pendant 2 à 5 heures.

5 3- Hybridation :

- Oter le mix de pré hybridation.

- Mélanger 40 µl ADN sperme de saumon + 40 µl ADN placentaire humain ; dénaturer 5 mn à 96°C, puis plonger dans la glace.

10 - Ajouter dans le tube d'hybridation 4 ml de mix formamide, le mélange des deux ADN et la sonde marquée/ADN Cot I dénaturée.

- Incuber 15 à 20 heures à 42°C, avec rotation.

4- Lavages :

- Un lavage à température ambiante dans du SSC 2X, pour rincer.

- 2 fois 5 minutes à température ambiante SSC 2X et SDS 0,1% à 65°C.

15 - 2 fois 15 minutes à 65°C SSC 1X et SDS 0,1% à 65°C.

Envelopper les membranes dans du Saran et exposer.

20 Les conditions d'hybridation décrites plus haut sont adaptées à l'hybridation dans des conditions de forte stringence, d'une molécule d'acide nucléique d'une longueur variable de 20 nucléotides à plusieurs centaines de nucléotides.

25 Il va sans dire que les conditions d'hybridation ci-dessus décrites peuvent être adaptées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont l'hybridation est recherchée ou du type de marquage choisi, selon des techniques connues de l'homme du métier.

30 Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de HAMES et HIGGINS (1985, "Nucleic acid hybridization : a practical approach", Hames and Higgins Ed., IRL Press, Oxford) ou encore dans l'ouvrage de F.AUSUBEL et al (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y).

35 Les protéines objets de la présente invention peuvent être obtenues par tous moyens connus de l'homme du métier. Elles sont néanmoins avantageusement obtenues par expression des acides nucléiques tels que décrits ci-dessus, codant pour ces protéines, éventuellement insérés dans des vecteurs d'expression, dans des cellules avantageusement choisies, suivie éventuellement par une extraction et une purification qui peut être totale ou partielle.

40 L'invention est également relative à un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique selon l'invention.

Avantageusement, un tel vecteur recombinant comprendra un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques suivants :

45

a) un acide nucléique codant pour une protéine ayant au moins 60% d'identité en acides aminés avec une séquence SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7 ou un fragment peptidique ou un variant de cette dernière ;

b) un acide nucléique comprenant un acide nucléique ayant une séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°4 ou SEQ ID N°6, ou un fragment ou un variant de ce dernier ;

5 c) un acide nucléique ayant au moins 60% d'identité en nucléotides avec un acide nucléique ayant une séquence SEQ ID N°4 ou SEQ ID N°6 ou un fragment ou un variant de ce dernier ;

d) un acide nucléique hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique de séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°4 ou SEQ ID N°6, ou un fragment ou un variant de ce dernier.

10 Par « vecteur » au sens de la présente invention on entendra une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme de simple brin ou double brin.

15 Selon un mode de réalisation, le vecteur d'expression comprend, outre un acide nucléique conforme à l'invention, des séquences régulatrices permettant d'en diriger la transcription et/ou la traduction.

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur recombinant selon l'invention comprendra notamment les éléments suivants :

20 (1) des éléments de régulation de l'expression de l'acide nucléique à insérer, tels que des promoteurs et des enhanceurs ;

(2) la séquence codante comprise dans l'acide nucléique conforme à l'invention à insérer dans un tel vecteur, ladite séquence codante étant placée en phase avec les signaux de régulation décrits aux (1) ; et

25 (3) des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriées.

30 En outre, les vecteurs recombinants selon l'invention pourront inclure une ou plusieurs origines de répllication chez les hôtes cellulaires dans lesquels leur amplification ou leur expression est recherchée, des marqueurs ou des marqueurs de sélection.

35 Des cellules comprenant de tels acides nucléiques et/ou exprimant de telles protéines constituent d'autres objets de la présente invention. La présente demande est de plus relative à un procédé de production de molécules de type héparine comprenant la mise en culture de cultures ou lignées de mastocytes porcins tels que décrits ci-dessus.

40 Les mastocytes, obtenus selon l'invention dans un milieu contenant de l'IL-3, du SCF et de l'IL-4, présentent une structure disaccharidique meilleure que ceux obtenus dans un milieu ne contenant que de l'IL-3 et du SCF.

45 La demanderesse a aussi montré que l'ajout d'IL-4 au milieu de culture permet d'obtenir à partir des mastocytes des molécules de type héparine présentant des caractéristiques plus proches de l'héparine porcine par rapport à celles obtenues en utilisant des cellules obtenues dans un milieu ne contenant que de l'IL-3 et du SCF ou contenant de l'IL-3 du SCF et de l'IL-6 ou de l'IL-3 du SCF et du G-CSF.

Aussi, la présente demande est de plus relative à un procédé de production de molécules de type héparine comprenant la mise en culture, dans un milieu adapté, de cultures ou lignées de mastocytes porcins dans un milieu de culture

comprenant au moins environ 0,1 ng/ml de IL-4 (préférentiellement au moins environ 0,5 ng/ml, encore plus préférentiellement au moins environ 1 ng/ml).

5 Des mastocytes peuvent aussi être modifiés afin de surexprimer de l'IL4. Ainsi un autre objet de la présente demande est un procédé de production de molécules de type héparine comprenant l'obtention de cultures ou lignées de mastocytes porcins transfectées par un acide nucléique codant pour l'IL4, et la mise en culture des ces cellules dans un milieu de culture adapté. De tels mastocytes constituent en eux-même un objet de la présente demande.

10 Ils peuvent être obtenus par toute méthode connue de l'homme du métier et en particulier par transfection, par nucléoporation ou par électroporation d'un acide nucléique comprenant un gène codant pour l'IL-4. Des vecteurs rétroviraux portant ces gènes peuvent aussi être utilisés pour transfecter ces cellules. La séquence de l'ADN complémentaire de l'IL-4 a été décrite par Bailey et al (Biochim.Biophys.Acta. 1171(3), 328-330, 1993).

20 Les cellules, lignées et cultures selon la présente invention peuvent être maintenues en culture dans les conditions dans lesquelles elles ont été obtenues. Elles peuvent aussi être maintenues en culture dans des milieux comprenant des quantités réduites de SCF, de GM-CSF, d'IL-3, d'IL-4 et/ou d'IL-6. Elles seront néanmoins préférentiellement maintenues dans un milieu contenant de l'IL-4.

25 Ces mastocytes seront de préférence cultivés dans un milieu de culture défini (MEM α /DMEM, RPMI, IMDM, ...) supplémenté en facteurs de croissance, utilisés en combinaison ou de façon individuelle.

Les milieux peuvent également être supplémentés avec du sérum bovin, à une concentration comprise entre 0,5% et 20% (v/v).

30 L'addition de sérum bovin dans les milieux de culture peut être remplacée par l'utilisation d'un milieu de culture sans sérum tel que AIMV (INVITROGEN) de façon à réduire la concentration protéique du milieu et les risques associés à l'utilisation de composés d'origine animale (KAMBE *et al.*, J. Immunol. Methods, 240, 101-10, 2000).

35 L'indépendance des cellules vis-à-vis de l'ajout de sérum et/ou de l'utilisation de facteurs de croissance, peut être obtenue par mutation du phénotype cellulaire par l'action d'agents transformants et/ou immortalisants (TSUJIMURA, Pathology International, 46, 933-8, 1996 ; PIAO et BERNSTEIN, Blood, 87(8), 3117-23, 1996).

40 Les mastocytes peuvent être cultivés en utilisant les techniques développées pour la culture en masse de cellules eucaryotes, comme décrit par exemple par GRIFFITHS *et al.* (Animal Cell Biology, Eds. Spier et Griffiths, Academic Press, Londres, vol.3, 179-220, 1986). On peut utiliser des bioréacteurs de capacité supérieure à plusieurs m³ comme décrit par PHILIPS *et al.* (Large Scale Mammalian Cell Culture, Eds. Feder et Tolbert, Academic Press, Orlando, U.S.A., 1985), ou par MIZRAHI (Process Biochem, Août, 9-12, 1983).

45 La culture peut également être réalisée en suspension ou sur micro-support selon la technique décrite par VAN WEZEL (Nature, 216, 64-65, 1967).

On peut également utiliser des systèmes de culture en lots (batch), qui sont fréquemment utilisés pour les cultures de cellules eucaryotes, du fait de leur plus grande simplicité de mise en œuvre à l'échelle industrielle (VOGEL et TODARO, Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, 2nd edition, Noyes Publication, Westwood, New Jersey, U.S.A., 1997). Les densités cellulaires obtenues avec ces systèmes sont généralement comprises entre 10^6 et 5×10^6 cellules/ml.

La productivité des cultures en batch peut être avantageusement augmentée en prélevant une partie des cellules du bioréacteur (70% à 90%) pour les opérations d'extraction des GAGs et d'isolement de l'héparine et en conservant les cellules restantes au sein du même bioréacteur pour initier une nouvelle culture. Dans ce mode de culture dit en batch répété on peut de plus distinguer les paramètres optimum de la phase de croissance cellulaire, de ceux permettant une plus grande accumulation de GAGs et d'héparine au sein des cellules.

Des systèmes de culture en continu de type perfusés, avec ou sans rétention cellulaire peuvent également être utilisés (VELEZ *et al.*, J. Immunol. Methods, 102(2), 275-278, 1987 ; CHAUBARD *et al.*, Gen. Eng. News, 20, 18-48, 2000).

Dans le cadre de la présente invention on peut notamment utiliser des systèmes de culture perfusés permettant la rétention des cellules à l'intérieur du réacteur, et aboutissant à une croissance et une production supérieure à celle pouvant être obtenue en batch. La rétention peut être effectuée par l'intermédiaire de systèmes de rétention de type filtre tournant (spin-filter), fibres creuses ou matrice solide (WANG *et al.*, Cytotechnology, 9, 41-49, 1992 ; VELEZ *et al.*, J. Immunol. Methods, 102(2), 275-278, 1987)

Les densités cellulaires obtenues sont généralement comprises entre 10^7 et 5×10^7 cellules/ml. La culture en bio-réacteurs permet, par l'utilisation de capteurs de mesure en ligne, un meilleur contrôle des paramètres physico-chimiques de la croissance cellulaire : pH, pO₂, Red/Ox, substrats de croissance tels que vitamines, acides aminés, substrats carbonés (par exemple glucose, fructose, galactose), métabolites tels que lactate ou ammoniacque, etc.

Il peut être envisagé d'augmenter quantitativement et qualitativement le contenu en molécules de type héparine des mastocytes suite à un traitement avec le sodium butyrate (Nakamura *et al.* (Biochim.Biophys.Acta. 627, 60-70, 1980). Après 3 à 14 jours de culture, de préférence après 3 à 5 jours, les cellules sont récoltées et séparées du milieu de culture, généralement par centrifugation ou filtration.

Différents systèmes de centrifugation peuvent être utilisés, on citera par exemple ceux décrits par VOGEL et TODARO (Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, 2nd Edition, Noyes Publication, Westwood, New Jersey, U.S.A.).

Alternativement ou en combinaison avec la centrifugation, on peut effectuer la séparation par microfiltration tangentielle, à l'aide de membranes dont la porosité est inférieure au diamètre moyen des cellules (5 à 20µm) tout en permettant le passage des autres composés en solution/suspension. La vitesse du flux tangentiel et la pression appliquée sur la membrane sera choisie de façon à

généraler peu de force de cisaillement (nombre de Reynolds inférieur à 5000 sec^{-1}) afin de réduire le colmatage des membranes et préserver l'intégrité des cellules pendant l'opération de séparation.

- 5 Différentes membranes peuvent être utilisées, par exemple, des membranes spirales (AMICON, MILLIPORE), des membranes planes ou des fibres creuses (AMICON, MILLIPORE, SARTORIUS, PALL, GF).

10 On peut aussi choisir des membranes dont la porosité, la charge ou le greffage permet d'effectuer une séparation et une première purification vis-à-vis d'éventuels contaminants pouvant être présents dans le milieu de culture, tels que protéines cellulaires, ADN, virus ou autres macromolécules.

15 L'utilisation de membranes de porosité plus réduite peut aussi être envisagée dans le cas où l'héparine aurait été libérée du contenu intracellulaire, par dégranulation ou lyse de tout ou partie des mastocytes, et est présente dans le milieu de culture au moment de l'étape de séparation. Dans ce cas, la séparation des cellules est combinée à une étape ultrafiltration sur une ou plusieurs membranes dont l'agencement et la porosité permet de concentrer l'héparine et
20 de la séparer des autres espèces présentes dans le milieu, en fonction de la taille et du poids moléculaire, et éventuellement de la charge électrique ou des propriétés biologiques.

25 Dans le cadre de ce mode de mise en œuvre, le seuil de coupure des membranes est de préférence compris entre 1000 et 5 Kda. On peut utiliser des systèmes de membranes similaires à ceux employés pour la micro-filtration, par exemple, membranes spirales, membranes planes ou fibres creuses. On peut avantageusement utiliser des membranes permettant d'effectuer une séparation et une purification de l'héparine, du fait de leurs propriétés de charge ou du greffage
30 de ligands présentant une affinité pour l'héparine (par exemple anticorps, ATIII, lectine).

Toutefois, on préférera généralement utiliser des méthodes de production et de récolte des cellules permettant de conserver l'héparine dans le contenu
35 intracellulaire.

La récupération de l'héparine à partir des mastocytes peut aussi se faire après dégranulation ou lyse des cellules.

La dégranulation peut être provoquée par la fixation de ligands spécifiques sur les récepteurs présents à la surface des mastocytes, par exemple la fixation d'agents
40 de type allergène (tels que fragment Fc des IgE ou analogues de ce fragment) sur les récepteurs IgE des mastocytes.

D'autres agents peuvent aussi induire une dégranulation des mastocytes. Ces agents peuvent être classés en plusieurs catégories telles que les agents
45 cytotoxiques, les enzymes, les polysaccharides, les lectines, les anaphylatoxines, les composés basiques (composé 48/80, substance P, etc), le calcium (ionophore A23187, ionomycine, etc). [D. Lagunoff and T. W. Martin. 1983. Agents that release histamine from mast cells. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23:331-51]. L'utilisation d'agent de dégranulation peut être effectuée de façon répétée sur les

mêmes cellules maintenues en culture. Dans ce mode de production la productivité est augmentée de façon significative par la simplification du procédé de récolte à partir du surnageant et par le maintien en culture des cellules.

5 Dans le cas particulier de l'ionophore A23187, la dégranulation des mastocytes peut être induite par exemple par traitement de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml de mastocytes avec l'ionophore A23187 à des concentrations comprises entre 1 à 100 $\mu\text{g/ml}$ et des temps d'action variant de 1 minute à 4 heures.

10 La lyse des mastocytes, peut être induite, par exemple, par choc osmotique en utilisant des solutions hypotoniques ou hypertoniques, par choc thermique (congélation/décongélation), par choc mécanique (par exemple sonication ou variation de pression), par action d'agents chimiques (NaOH, THESITTM, NP40TM, TWEEN 20TM, BRIJ-58TM, TRITON XTM-100,...) ou par lyse enzymatique (papaïne, trypsine,...) ou par combinaison de deux ou plusieurs de ces méthodes.

15 Pour extraire et purifier l'héparine à partir du lysat cellulaire, séparer les chaînes polysaccharidiques du noyau serglycine, et séparer les chaînes d'héparine des autres GAGs présents dans le milieu d'extraction, on pourra utiliser des méthodes similaires à celles utilisées dans le cadre de l'extraction et la purification
20 d'héparine à partir de tissus animaux, qui sont connues en elles-mêmes, et décrites dans des ouvrages généraux, tels que le manuel de DUCLOS, cité ci-dessus).

25 A titre d'exemples non-limitatifs, pour séparer l'héparine des acides nucléiques et des protéines cellulaires, et la solubiliser, c'est à dire rompre les liaisons avec le noyau serglycine :

- on peut soumettre le lysat cellulaire à une ou plusieurs digestions enzymatiques (pronase, trypsine, papaïne, etc...) ;
- 30 – les liaisons héparine-protéine peuvent être hydrolysées en milieu alcalin, en présence de sulfates ou de chlorures ;
- on peut également effectuer un traitement en milieu acide (par exemple par de l'acide trichloracétique à froid) pour détruire les acides nucléiques et les protéines provenant des cellules, complété par l'utilisation d'une solution ionique qui permet de dissocier les interactions GAGs-protéines.

35 On peut également effectuer une extraction par la guanidine, après hydrolyse enzymatique ; pour purifier l'héparine solubilisée, on peut par exemple la précipiter par l'acétate de potassium, par un ammonium quaternaire, par l'acétone, etc.

40 Ces étapes de purification peuvent avantageusement être complétées ou remplacées par une ou plusieurs étapes de chromatographie, notamment de chromatographie d'échange d'anions.

45 La présente invention a également pour objet les préparations d'héparine susceptibles d'être obtenues à partir de cultures de mastocytes en mettant en œuvre un procédé selon l'invention.

Les préparations d'héparine conformes à l'invention, qui possèdent des propriétés biologiques comparables à celles des préparations d'héparine obtenues dans l'art antérieur à partir de tissus animaux, peuvent être utilisées dans toutes les applications usuelles de l'héparine.

Les figures 1 A à 1H illustrent le marquage anti-tryptase des mastocytes obtenus après 3 semaines de culture, respectivement dans les conditions C1 à C8. Les pics ombrés et clairs correspondent respectivement aux témoins (sans anticorps) et aux cellules obtenues dans les conditions C1 à C8.

Les figures 2 A à 2H illustrent le marquage des récepteurs IgE des mastocytes obtenus après 5 semaines de culture, respectivement dans les conditions C1 à C8. Les pics hachurés, ombrés et clairs correspondent respectivement à des cellules non-marquées (cellules porcines non-mastocytaires), à des cellules témoins et aux cellules obtenues dans les conditions C1 à C8.

Les figures 3 A à 3H illustrent le marquage anti-tryptase des mastocytes obtenus après 7 semaines de culture, respectivement dans les conditions C1 à C8. Les pics ombrés et clairs correspondent respectivement aux témoins et aux cellules obtenues dans les conditions C1 à C8.

Les figures 4 A à 4H illustrent le marquage FGF des mastocytes obtenus après 8 semaines de culture, respectivement dans les conditions C1 à C8. Les pics ombrés et clairs correspondent respectivement aux témoins et aux cellules obtenues dans les conditions C1 à C8.

La figure 5 illustre la croissance des cultures dans les différentes conditions C1 à C8 dans les 7 premières semaines de culture.

La figure 6 représente les structures chimiques des disaccharides Is, IIs IIs et IVs correspondant aux disaccharides N sulfatés de l'héparine, ainsi que les disaccharides homologues acétylés Ia, IIIa et IVa.

La figure 7 illustre la croissance en réacteur des mastocytes obtenus dans les conditions C1, C7 et C8.

La présente invention est illustrée par les exemples de mise en œuvre qui suivent. Ces exemples sont purement illustratifs et ne doivent pas être considérés comme limitatifs.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Isolement de populations de mastocytes à partir de moelle osseuse de jeunes porcs et obtention de lignées

Les animaux utilisés pour les prélèvements sont issus d'élevages protégés, indemnes d'organismes pathogènes spécifiques (IOPS) du porc (MERIAL SA Lyon France) Le sternum de porcelets âgés de quatre et six semaines, respectivement PI et PIII sont prélevé aseptiquement puis transporté dans un container stérile au laboratoire pour être décontaminé et rincé par successivement une solution d'eau de javel pure diluée au 1/100 en tampon PBS (Phosphate Buffer Saline pH 7.4) puis en PBS. Les sternum sont ensuite coupés, puis la moelle osseuse est aspirée à l'aide d'une seringue pour être ensuite dilué en PBS.

La suspension médullaire est tamisée sur une compresse stérile ; diluée dans 40 ml de PBS puis centrifugée 10 minutes à 400 g. Le culot cellulaire est repris dans 5 ml de PBS puis purifié sur 5ml de Ficoll (Dutscher) (1100gx10'). L'anneau contenant les cellules médullaires est récupéré puis rincé deux fois en PBS (14ml, 400gx10min) puis repris dans 2 ml de PBS pour être comptée, environ 1x 10⁸ cellules totales par sternum.

Après comptage, les cellules sont centrifugées puis reprise à une concentration de 1-3 x10⁶ cellules /ml en plaques de culture 6 puits et 4 ml par puits dans le milieu contenant les composants suivants : MEM α (Invitrogen) Sérum de veau Fetal 15% (PAA Laboratories) Penicilline (Sigma) 100 UI/ml, 100 μ g/ml Streptomycine (Sigma) 2ng/ml r-IL3 porcine (Biotransplant) 80ng/ml r-SCF porcine (Biotransplant). Dès la mise en culture les cellules sont cultivées dans le milieu de cultures décrit ci-dessus supplémenté en cytokines (IL4 recombinante porcine 1ng/ml R1D systems; IL6 recombinante porcine 100ng/ml, R&D systems; G-CSF humain recombinant 10ng/ml) comme indiqué dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : conditions de culture des cellules

cytokines	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
IL4	+	-	+	-	+	-	+	-
IL6	+	+	-	-	+	+	-	-
G-CSF	+	+	+	+	-	-	-	-

(+ milieu avec; - milieu sans cytokine)

Les plaques de cultures sont incubées à 38°C +/- 0.5 ° et sous atmosphère à 5% de CO₂.

Deux fois par semaine et pendant huit semaines, le milieu de chaque puits est renouvelé avec du milieu frais. La caractérisation du phénotype mastocytes des cellules isolées est réalisée dès la semaine 2 puis à intervalles réguliers (semaine 3, semaine 5 et semaine 7)

Des lignées de mastocytes porcins, obtenues dans certaines des conditions indiquées ci-dessus, ont été déposées auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur (CNCM) le 09 avril 2003.

Ces lignées déposées sous les n° I-3010, I-3011, I-3012, I-3013, I-3014 ont été respectivement obtenues dans les conditions C1, C2, C3, C4 et C5 décrites dans le tableau 1.

La confirmation du phénotype mastocyte des cellules dans chaque condition de culture est mise en évidence par la détection en fluorocytométrie de la présence des marqueurs spécifiques tel que récepteur aux IgE, et tryptase. La détection du marquage avec le FGF est aussi réalisée pour la révélation du site de fixation du FGF sur l'héparine des mastocytes.

Marquage de la tryptase

1 ml de suspension cellulaire de chaque condition est prélevé. Chaque échantillon est rincé une fois par centrifugation en tampon PBS, puis les cellules sont re-suspendues dans 400µl de tampon PBS contenant 0.5% de BSA (Bovine Sérum Albumine) et 0.01% d'azide de sodium.

Les cellules sont ensuite perméabilisées à 4°C en solution cytofix/cytoperm (Pharmingen), 200µl par échantillon et incubées 25 minutes. Après deux rinçages en tampon permawash(Pharmingen) les échantillons sont incubés 30 minutes à 4°C avec 1µg d'anticorps monoclonal murin spécifique de la tryptase (Mouse anti-human Mast cell tryptase; Chemicon)

Après trois rinçages en tampon permawash, le marquage est révélé par incubation pendant 25 minutes avec un conjugué anti immunoglobulines de souris marqué au FITC (FITC-conjugates Affinity pure Goat Anti Mouse IgG ; Jackson Immunoresearch)

Des dupliques d'échantillons sont réalisés selon la même procédure à l'exception de l'incubation avec l'anticorps anti tryptase afin de pouvoir soustraire lors de l'analyse la fluorescence due à la liaison non spécifique du conjugué marqué FITC.

A la fin de la dernière incubation, les cellules sont rincées deux fois en tampon permawash, puis remise en suspension en tampon PBS froid additionné de 1% de formaldéhyde (Sigma)

L'analyse en cytofluorimétrie est réalisée sur FACS (Faxcalibur Becton Dickinson)

Marquage du récepteur aux IgE

Environ 2×10^5 cellules de chaque condition sont prélevées, rincées deux fois en PBS puis incubées avec 2µg pour 10^6 cellules d'IgE canine (Monoclonal Canine IgE; Bethyl) Les échantillons sont incubés 3h30min à 37°C, puis rincée deux fois en PBS. Après remise en suspension en PBS, les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 minutes à 4°C avec 5µg pour 10^6 cellules d'anticorps de chèvre anti IgE canine (Goat anti Dog IgE affinity purified; Bethyl)

Après incubation, les échantillons sont rincés de nouveau deux fois en PBS, puis incubés pendant 30 minutes avec un conjugué anti Ig de chèvre marqué au FITC (Donkey anti Goat/Sheep FITC; Serotec) Après deux rinçages en tampon PBS, les échantillons sont remis en suspension et fixés en tampon additionné de 1% de formaldéhyde. Comme précédemment des dupliques d'échantillons sont aussi réalisés en omettant l'incubation avec l'IgE afin de soustraire lors de l'analyse la fluorescence due à la liaison non spécifique du conjugué marqué FITC. Un échantillon de cellules porcines non mastocytaire (IRP) est aussi analysé dans les mêmes conditions afin de confirmer la spécificité du marquage.

Marquage du site de fixation du FGF.

Les échantillons de culture cellulaire à analyser sont répartis dans une plaque 96 puits, fond conique, à raison de $0,2 \cdot 10^6$ par puits puis centrifugés à 1400 trs/mn, 4 mn. Le culot cellulaire est rincé dans 100µl de tampon PBS contenant 5g/l

d'albumine bovine puis centrifugé à 1400 trs/mn, 4 mn. Deux rinçages successifs sont réalisés dans les mêmes conditions.

5 Les culots cellulaires sont dilués dans un tampon de fixation/perméabilisation Cytofix/Cytoperm, (Pharmingen), rincé dans 100µl de tampon Perm/Wash (Pharmingen) puis centrifugé à 1400 trs/mn, 4 mn, 4°C. Trois rinçages successifs sont réalisés dans les mêmes conditions.

10 Les culots cellulaires sont dilués dans 100µl de tampon Perm/Wash contenant 172 ng/ml de FGF basic (R&D systems) et incubés 30 minutes dans la glace. Les cellules sont rincées dans 100µl de tampon Perm/Wash™ puis centrifugées à 1400 trs/mn, 4 mn, 4°C. Trois rinçages successifs sont réalisés dans les mêmes conditions.

15 Les culots cellulaires sont dilués dans 100µl de tampon Perm/Wash contenant 1µg d'anticorps monoclonal de souris anti-FGF basic (R&D systems) couplé à la biotine et incubés 30 minutes dans la glace. Les cellules sont rincées dans 100µl de tampon Perm/Wash puis centrifugées à 1400 trs/mn, 4 mn, 4°C. Trois rinçages successifs sont réalisés dans les mêmes conditions.

20 Les culots cellulaires sont dilués dans 100µl de tampon Perm/Wash contenant une solution de streptavidin peridinin chlorophyll-a protein et incubés 20 minutes, dans la glace, à l'obscurité. Les cellules sont rincées dans 100µl de tampon Perm/Wash™ puis centrifugées à 1400 trs/mn, 4 mn, 4°C. Trois rinçages
25 successifs sont réalisés dans les mêmes conditions. Le culot est dilué dans 150µl de tampon PBS froid contenant 5g/l d'albumine bovine, 0,01% d'azide de sodium, 1% formaldéhyde. La présence du marquage intra cytoplasmique est détectée par cytofluorimétrie.

30 Des duplicas d'échantillons sont réalisés selon la même procédure à l'exception de l'incubation avec l'anticorps anti-FGF afin de pouvoir soustraire lors de l'analyse la fluorescence due à la liaison non spécifique du conjugué marqué FITC. Un échantillon de cellules porcines non mastocytaire (IRP) est aussi analysé dans les mêmes conditions afin de confirmer la spécificité du marquage

35 Les figures 1, 2, 3 et 4 présentent les résultats de la caractérisation phénotypique des mastocytes obtenus respectivement après 3, 7 et 8 semaines de culture.

On observe un marquage positif et spécifique des cellules vis à vis des marqueurs des mastocytes, récepteur IgE, et tryptase ainsi que la détection de la liaison
40 intracellulaire du FGF. La détection réalisée sur les cellules à partir de la troisième semaine de mise en culture est positive pour la présence de tryptase. Les cultures dans les conditions 1 à 5 sont homogènes, et contiennent 100% de mastocytes, comme révélé par un marquage du récepteur aux IgE à partir de la semaine 5.

45 En semaine 7, les cultures en conditions C1 à C5 et C7 sont homogènes à 100%, l'homogénéité des cultures en conditions C6 et C8 est supérieure à 50%.

Analyse en microscopie Electronique

La caractérisation des cellules isolée a aussi été complétée par observation en microscopie électronique. Les cellules présente une morphologie caractéristique

des mastocytes avec de nombreuses granulations, avec un gros noyau excentré, un contour irrégulier.

Prolifération cellulaire lors de l'isolement

5 A intervalles réguliers, des échantillons de culture pour chaque condition (C1 à C8) sont prélevés et comptés au microscope après dilution en tampon PBS additionné de 0.4% de bleu trypan.

On observe une diminution de la concentration cellulaire lors des quatre premières semaines de culture (S1 à S4) correspondant à la mort et la lyse des cellules médullaire non stimulées par le SCF et au passage d'une culture hétérogène à une culture essentiellement mastocytaire. Dès la cinquième semaine (S5) on observe une prolifération des cultures corrélée avec un marquage plus intense des marqueurs spécifiques de mastocytes. La prolifération est sensiblement plus importante pour les conditions de culture comprenant de l'IL4 (figure 5).

15

Caractérisation du contenu héparine des cultures en HPLC

Après 15 semaines de culture et amplification, des échantillons ont été prélevés pour analyser la composition en protéoglycanes des mastocytes selon le protocole décrit par Linhardt et al (Biomethods, 9, 183-197, 1997) Les échantillons sont traités de la façon suivante :

20 **Protéolyse** : Les échantillons cellulaires, 2×10^6 cellules, sont centrifugés et rincés deux fois en tampon PBS. Chaque culot est repris dans 100µl d'eau distillée additionnés de 10µl d'alcalase (Novozymes) puis chauffé pendant 5 heures à 60°C sous agitation. Puis les échantillons sont dilués avec 200µl de tampon Tris 10mM pH 7.0 (Prolabo) 0.5M NaCl (Prolabo) avant d'être centrifugés pendant 10 minutes à 10.000 Trs/min. L'étape de protéolyse permet de libérer le contenu intracellulaire et de dissocier les liaisons protéines-polysaccharides.

30 **Extraction** : Le surnageant de chaque échantillon est purifié par échange d'ions sur résine ammonium quaternaire SAX en format plaque 96 puits, 100mg/2ml (Thermohypersil).. Après fixation et lavage en tampon Tris pH7, NaCl 0.5M, les Glyco-aminoglycans (GAGs) sont élués par 500 µl de tampon Tris pH7.0, NaCl 3M.

35 **Dessalage/concentration** :

Les échantillons sont ensuite dessalés sur colonne de gel perméation (NAP-5, Pharmacia)

Après élution dans un volume de 1 ml, les échantillons sont concentrés par lyophilisation, puis repris dans 130µl d'eau distillée.

40 **Dépolymérisation.**

Pour l'analyse HPLC, les GAGs sont dépolymérisés par un mélange d'héparinases I, II et III (Grampian enzymes) Chaque solution d'héparinase est ajustée à 0.5UI/ml en tampon phosphate. La solution d'héparinases I, II, III est préparée en mélangeant 1/3 volume à volume de chaque solution d'héparinase.

45 Pour 100 µl d'échantillon à analyser, on ajoute 15µl du mélange d'héparinase et 10µl de tampon acétate contenant 0.73 ml d'acide acétique 100% (Prolabo) 12.5mg d'albumine bovine (Sigma) et 39.5 mg d'acétate de calcium (Prolabo) pour 30 ml d'eau distillée.



Analyse HPLC.

Les échantillons sont ensuite analysés par HPLC sur colonne Waters spherisorb SAX 5µm, 250x3mm, Thermohypersil. 50 µl d'échantillon sont injectés par analyse, le tampon de la phase mobile est composé de 2.5mM de Sodium Di Hydrogeno Phosphate (Na₂HPO₄, Prolabo) dont le pH est ajusté à 2.9 avec de l'acide ortho-phosphorique (H₃PO₄, Prolabo). L'élution des disaccharides constitutifs des GAGs extraits des échantillons cellulaires est réalisé dans un gradient de 0 à 100% en 50 minutes de tampon Na₂HPO₄ 2.5 mM et 1M de perchlorate (NaClO₄, Prolabo) Les disaccharides sont détectés par leur temps de rétention et par rapport à un échantillon d'héparine standard (Aventis) en UV à 234 nM.

L'analyse des cultures cellulaire après 15 semaines de culture révèle la présence en quantités importantes de composés de type héparine dans les cellules, confirmant la nature spécifiquement mastocytaire des cultures isolées.

On retrouve en effet les disaccharides majeurs constitutifs de l'héparine tel que décrit par Linhardt et al (Biomethods, 9, 183-197, 1997).

Ces disaccharides sont principalement représentés par le Is, IIs IIIs et IVs (structures chimiques représentées sur la figure 6) correspondant aux disaccharides N sulfatés de l'héparine. On retrouve aussi les disaccharides homologues acétylés IIa, IIIa et IVa (figure 6).

Le tableau 2 présente les compositions obtenues pour chaque culture.

On observe une modulation reproductible de la structure disaccharidique en fonction de la présence ou non d'IL4, cette modulation est majoritairement observée sur le pourcentage des disaccharides IIs et IIIs.

EXEMPLE 2 : Mise en culture des lignées et analyse de la production de molécules de type héparine

Le profil disaccharidique des mastocytes isolée, a été analysé pour trois conditions de milieux de culture (C1, C7 et C8) Les cellules ont été amplifiées en suspension et mises en culture en spinner de 100ml.

Culture cellulaire.

La densité cellulaire initiale est de 2×10^5 cellules par ml, les cellules sont incubées sous atmosphère de 5% de CO₂ à 37°C et un comptage à intervalle régulier est effectué au microscope.

Des échantillons des cultures ainsi réalisées sont prélevés lors des comptages pour analyse en HPLC du contenu en polysaccharides de types héparine et mesure de l'activité biologique anti IIa et anti Xa.

Dans ces conditions, la densité cellulaire maximale est comprise entre 4 et $6 \cdot 10^5$ cellules/ml avec un temps de doublement en phase exponentielle compris entre 24 et 48 heures.

La figure 7 illustre la croissance des mastocytes au 14ème passage.

Analyse des polysaccharides.

L'analyse en HPLC des échantillons pour trois jours de récolte (J4, J7 et J10) montre pour toutes les cultures un profil de type héparinique des polysaccharides avec un effet de l'IL4 sur le pourcentage relatif des disaccharides IIs et IIIs. La productivité des cultures est significative, comprise entre 2 et 12 μg pour 10^6 cellules.

Par comparaison, les cultures de lignées de mastocytes de l'espèce murine tel que les cellules MST décrite par Montgomery et al (Proc.Natl. Acad. Sci., 89, 11327-11331, 1992) ou la lignée humaine de mastocytes HMC1 (Butterfield et al Leuk Res, 12(4),345-355,1988) présentent une productivité de composés de type héparine 20 à 200 fois inférieure aux lignées porcine objets de la présente invention. (Tableaux 3 et 4)

Activité biologique des polysaccharides :

L'inactivation des facteurs Xa et IIa est caractéristique de l'héparine et permet de la différencier de l'héparane sulfate et du dermatane. La méthode utilisée est celle décrite dans la monographie de la pharmacopée Européenne 3^{ème} édition (1997).

La réaction se déroule en trois étapes :

1 : ATIII + héparine

[ATIII – Héparine]

2 : [ATIII – Héparine] + Facteur en excès
+ Facteur résiduel

[ATIII-Heparine-Facteur]

3 : Facteur résiduel + Substrat chromophore

Para-nitroaniline coloré

La quantité de Paranitroaniline libérée est inversement proportionnelle à la quantité d'héparine.

La quantité anti-Xa ou Anti-IIa est mesurée par rapport à une droite d'étalonnage établie avec le standard SPIM (Standard International Héparine) La sensibilité de la méthode est de 0.006UI/ml.

L'activité biologique est exprimée en UI/mg en tenant compte de la quantification des disaccharides obtenue par HPLC.

L'analyse réalisée au 10 jour de récolte après la fin de la phase de croissance révèle une activité biologique anti-Xa et anti-IIa comprise entre 10 à 25 UI/mg.

On remarque que pour ce stade de la culture, que le ratio entre les deux activités est proche de 1, ce qui est le ratio caractéristique de l'héparine issue de l'extraction à partir de la muqueuse intestinale de porc.

Les résultats obtenus par mesure de l'inactivation des facteurs Xa et IIa sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5: mesure de l'inactivation des facteurs Xa et IIa

Condition	C1	C7	C8
Activité anti-IIa (UI/mg)	12	12	26
Activité anti-Xa (UI/mg)	12	12	26

EXEMPLE 3 : Modification génétique des cellules isolées

Les mastocytes peuvent être modifiés génétiquement par l'introduction d'un acide nucléique exogène en utilisant par exemple des techniques de transfection, d'électroporation, de nucléoporation ou d'infection ce qui résultera en l'expression transitoire ou stable de l'acide nucléique introduit. Dans le cas d'une expression stable, l'ADN peut être intégré dans le génome cellulaire ou être maintenu comme épisode.

1 Transfection par nucléoporation et électroporation.

Des cellules transfectées stablement peuvent être obtenues en utilisant la méthode de nucléoporation décrite ci-dessous, en appliquant, 24 à 72 heures après la nucléoporation, une pression de sélection (hygromycine, généticine, blasticidine, puromycine ou zeocine. La résistance à l'agent de sélection est conférée par l'intégration du plasmide porteur du gène d'intérêt et du gène de résistance.

Nucléoporation

Cette méthode, est utilisée préférentiellement car elle permet de cibler l'ADN directement dans le noyau.

1 à $2 \cdot 10^6$ mastocytes, en phase exponentielle, préférentiellement après 3 ou 4 jours de culture, sont centrifugés à 1000 rpm 5 minutes et repris dans 100 μ l de solution de nucléofection (Amaxa, Kit 8351). 2 à 4 μ g de pcDNA3.1-eGFP, plasmide codant pour la GFP, sont ensuite ajoutés à la suspension cellulaire. Les cellules sont alors transférées dans la cuvette d'électroporation et soumises à un choc électrique par l'utilisation d'un programme spécifique (comme U14, T20 et T22 AMAXA)

Les cellules sont ensuite transférées dans 2 ml de milieu complet préchauffé à 37°C puis incubées à 37°C, 5%CO₂.

24 à 48 heures après la transfection, les cellules sont récoltées pour être fixées au paraformaldéhyde (Prolabo) 1 %. Pour cela, la totalité de la culture est centrifugée 5 min à 1000 rpm. Après élimination du surnageant, les cellules sont lavées dans 4 ml de PBS 1x puis centrifugées à nouveau. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 1 ml de paraformaldéhyde 1 %. Les cellules ainsi fixées sont ensuite analysées au cytomètre (Cytomics FC 500, Beckman Coulter)

Les conditions de nucléoporation décrites ci-dessus permettent de transfecter les mastocytes de porc avec une efficacité de transfection comprise entre 30 à 50 % tout en obtenant une bonne viabilité cellulaire, supérieure à 50%.

Electroporation

1 à $5 \cdot 10^6$ cellules, en phase exponentielle, sont mises en contact avec 1 à 30 μ g d'ADN. Les cellules, transférées dans une cuvette d'électroporation 4 mm, sont incubées 5 min dans la glace avant d'être électroporées à un voltage compris entre 150 V et 400 V avec une capacitance de 500 ou 960 μ F (Gene Pulser II, Biorad) Après électroporation, les cellules sont à nouveau incubées 5 min dans la

glace pour être finalement transférées dans 5 ml de milieu de culture complet et incubées à 37°C, 5%CO₂.

Le processus de sélection de cellules ayant intégrées le transgène de façon stable utilise la même technique que décrit ci-dessus en utilisant la résistance conférée par l'intégration du plasmide à un agent de sélection.

2 Transfection par des vecteurs viraux, utilisation de vecteurs retro-viraux pantropiques.

Alternativement aux méthodes de transfection par électroporation et nucléoporation, on peut utiliser des vecteurs retro-viraux recombinants et délétés pour la réplication. On peut par exemple utiliser des vecteurs pseudo typés avec la glycoprotéine d'enveloppe du *vesicular stomatitis virus* (VSV-G) qui permet la production de vecteurs retro-viraux pantropiques, capable d'infecter des cellules porcines.

Dans ce mode de transfection, le vecteur rétro-viral porteur du gène d'intérêt à exprimer ou intégrer dans le mastocyte porcin est produit dans un premier temps à l'aide du cellule d'emballage telle que GP-293 (Clontech protocol ref PT 3132-1), qui possède les éléments génétique pour la production du vecteur (*gag* et *pol*) à l'exception du gène pour la production de la protéine d'enveloppe pseudo-typée (*env*- VSV-G).

Lors de la production du vecteur rétro-viral, les cellules d'emballage sont co-transfectées avec le plasmide codant pour le gène d'enveloppe VSV-G et un plasmide rétro-viral codant pour le gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur avec ou sans gène de sélection.

Pratiquement, les cellules GP-293 sont mises en culture 48h à 72 heures avant la transfection afin d'être en phase exponentielle de croissance. Le jour de la transfection, le milieu de culture est changé par du milieu frais (15-20 ml pour 10⁶ cellules), puis 1 à 2 ml de solution contenant le mélange du plasmide VSV-G (5 à 20µg pour 10⁶ cellules) et du plasmide porteur du gène d'intérêt (10 à 30 µg pour 10⁶ cellules), en tampon pH7 phosphate de calcium sont ajoutés goutte à goutte dans le milieu de culture (1 à 2ml (Promega)

Les cellules sont ensuite remises à incuber pendant 16 à 24 heures à 37°C ou préférablement à une température comprise entre 32 et 35°C. Le milieu de culture est changé à nouveau avec du milieu frais. Les cellules sont incubées pendant 48 heures supplémentaires à 32-35 °C. A la fin de la période d'incubation, le surnageant de culture contenant les vecteurs rétro-viraux néo-formés est récolté. Une partie du surnageant d'infection des cellules d'emballage est aliquoté et congelé à -80°C, l'autre partie est mélangée au milieu de culture des mastocytes en phase exponentielle de croissance. En pratique les mastocytes en culture sont centrifugés et resuspendus dans un milieu contenant 50% de milieu frais et 50% de surnageant d'infection. Les mastocytes sont mis à incuber pendant 24 heures à 32-35 °C, puis le milieu est changé à nouveau par du milieu frais.



48 à 72 heures après l'infection des mastocytes, des échantillons sont prélevés pour analyser par cytofluorimétrie dans le cas du témoin d'infection avec le gène rapporteur fluorescent GFP (Green Fluorescent Protein) ou par PCR pour les infections avec le gène d'intérêt. Par cytofluorimétrie la mesure de l'efficacité de transfection est supérieure à 20% des cellules totales.

Les populations de cellules transfectées sont ensuite sélectionnées en ajoutant dans le milieu de culture l'agent cytotoxique (Hygromycine, puromycine, G418, Zeocyne) pour lequel seuls les mastocytes transfectés avec le vecteur retro-viral porteur du gène d'intérêt et du gène de résistance continuent à pousser. Par cette méthode le gène d'intérêt est stablement intégré et s'exprime de manière stable. Après sélection et clonage des populations, l'agent de sélection peut être enlevé du milieu de culture tout en conservant l'expression du gène d'intérêt. Le vecteur rétroviral produit de cette façon ne se réplique pas dans le mastocyte hôte et il n'y a donc pas production de vecteurs répliatifs.

Alternativement, on peut aussi utiliser des vecteurs pour lesquels l'expression est soumise à une induction du promoteur régulant l'expression du gène d'intérêt par un composé ajouté au moment voulu dans le milieu de culture.

EXEMPLE 4 : Isolement du gène c-kit porcin

Le gène c-kit porcin a été isolé par 3'-RACE en utilisant comme source d'ARN, des ARN totaux isolés à partir d'une culture de mastocytes de foie de porc d'après la procédure publiée précédemment (Piu et al, CR Acad. Sci. Paris, 316, 772-779, 1993).

La transcription inverse de 2 µg d'ARN totaux en ADNc a été effectuée en suivant le protocole du kit 5'/3' RACE (Roche), en utilisant comme amorce un oligodT nommé OligodT anchor primer de séquence SEQ ID N°8 5' gac cac gcg tat cga tgt cga ctt ttt ttt ttt ttv 3'. L'ADNc est ensuite amplifié par PCR en utilisant le protocole du kit Expand High fidelity system (Roche).

La PCR a été réalisée sur 1 µl d'ADNc, avec l'amorce sens C15203 s'hybridant spécifiquement dans la région 5' non codante du gène c-kit porcin (nucléotides 24 à 42 par rapport à la séquence c-kit porcin publiée, Réf GenBank AJ223228) de séquence SEQ ID N°9 5' gga att cct cga gag cag gaa cgt gga aag gag 3' et l'amorce anti-sens nommée PCR anchor primer de séquence SEQ ID N°10 5' gac cac gcg tat cga tgt cga c 3' s'hybridant de façon spécifique en 3' au niveau de l'amorce oligo dT. 10 cycles puis 25 cycles PCR ont été appliqués (cycle 1 : 15 sec de dénaturation à 94 °C, 45 sec d'hybridation à 55°C et 4 min d'élongation à 68°C, cycle 2 : 15 sec de dénaturation à 94 °C, 45 sec d'hybridation à 60°C et 4 min d'élongation à 68°C).

Le produit PCR obtenu est purifié sur gel agarose 1 % TBE1x, en utilisant le kit Quiaquick gel extraction kit (Quiagen).

Une seconde PCR, identique à la première est réalisée sur 1/30^{ième} du produit PCR purifié, en appliquant 25 cycles thermiques (15 sec de dénaturation à 94 °C, 45 sec d'hybridation à 60°C et 4 min d'élongation à 68°C). A l'issue de la seconde

PCR, le produit PCR est à nouveau purifié pour le cloner dans un vecteur pGEMTeasy suivant le protocole pGEM-T Easy vector system (Promega).

La séquence du gène porcin est ensuite partiellement déterminée par séquençage. La séquence nucléotidique obtenue est la séquence SEQ ID N°1. La séquence protéique déduite est la séquence SEQ ID N°2. Cette séquence SEQ ID N°1 montre des différences par rapport à la séquence publiée sous la référence AJ 223228. En effet l'extrémité C terminale présente 9 acides aminés supplémentaires et les différences suivantes dans la séquence nucléotidique ont été observées, conduisant à la modification de deux acides aminés :

Modifications(par rapport à la séquence publiée AJ 223228):

nt 237 t → g, : H → Q

nt 351 a → t

nt 523 a → c

nt 606 c → t

nt 609 g → a

nt 635 g → a, : R → K

nt 639 c → t

nt 663 c → g

nt 669 c → a

nt 2016 a → g

nt 2865 c → t

EXEMPLE 5: Isolement et séquençage de la séquence 3' codante du gène 3-OST porcin

La séquence partielle du gène porcin codant pour la 3-OST est disponible dans une banque EST (GenBank accession number BF075483). L'alignement de cette séquence avec la séquence humaine montre qu'il manque environ 650 pb de la région codante en 3'.

La portion manquante du gène 3-OST porcin a été identifiée en combinant la RT-PCR et le 3'-RACE en utilisant comme source d'ARN, des ARN de foie de porc isolés d'après le protocole du kit Trizol (Invitrogen)

La transcription inverse de 2 µg d'ARN totaux en ADNc a été effectuée en suivant le protocole du kit First Strand Synthesis Sytem (Invitrogen), en utilisant comme amorce un mélange des oligonucléotides BS02 et BS03 de séquences respectives **SEQ ID N°11** 5'-GCA GCA GCC ACG TCG GG-3' et **SEQ ID N°12** 5'-TCA GTG YCA GTC RAA TGT TC-3'.

2 µl de ces ADNc ont ensuite été amplifiés par PCR en présence d'une amorce sens BS05 de séquence **SEQ ID N°13** 5'-CGG NGA CCG CCT NAT CAG-3' et d'une amorce anti-sens BS06 de séquence **SEQ ID N°14** 5'-TCA GTG YCA GTC RAA TGT TC-3' avec la KOD hot start Polymerase (Novagen). Après les 30 cycles thermiques (15 sec de dénaturation à 98°C, 30 sec d'hybridation à 60°C et 30 sec d'élongation à 68°C), le fragment amplifié de 277 pb a été cloné dans le vecteur pCR-Blunt II TOPO (Invitrogen, Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit) puis séquencé.

La séquence de ce fragment a été utilisée pour générer 2 amorces BS21 et BS22 pour isoler, par 3'-RACE, la totalité de la région 3'.

5 Dans le cadre du 3'-RACE, 1 µl d'ARN porcin de foie a été reverse transcrit en ADNc d'après le protocole du kit First Strand Synthesis Sytem de Invitrogen, en utilisant comme amorce l'oligodT CDSIII de séquence **SEQ ID N°15** (5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG T₃₀ VN-3').

10 La région 3' du gène codant pour la 3-OST a été ensuite amplifiée par 2 PCR successives. La première PCR a été réalisée sur 2 µl d'ADNc, obtenu précédemment, avec l'amorce sens BS21 de séquence **SEQ ID N°16** 5'-GCA CCC CCA GAT CGA CCC C-3' et une amorce anti-sens CDSIII. 30 cycles thermiques ont été appliqués (10 sec de dénaturation à 94°C, 30 sec d'hybridation à 60°C et 120 sec d'élongation à 68°C). La seconde PCR a ensuite été réalisée
15 dans les mêmes conditions que la première PCR avec 1 µl de produit issu de la première PCR en utilisant l'amorce sens BS22 de séquence **SEQ ID N°17** 5'-CAA ACT CCT CAA TAA ACT GCA CG-3' et l'amorce anti-sens CDSIII.

20 Le séquençage du produit PCR ainsi obtenu à l'issue du 3'-RACE a permis d'identifier la séquence 3' de la 3-OST porcine ainsi qu'environ 250 pb de la région non codante.

Isolement de la phase codante complète du gène 3-OST porcin.

25 Afin de cloner la phase codante complète de la 3-OST porcine, une nouvelle expérience de RT-PCR a été réalisée en utilisant les informations obtenues dans la première étape.

La source d'ARN est la même que dans l'étape précédente.

30 2 µg d'ARN ont été reverse transcrit en ADNc d'après le protocole du kit First Strand Synthesis Sytem de Invitrogen, en utilisant comme amorce un oligonucléotide dT₂₄.

Le gène codant pour la 3-OST a été ensuite amplifié par PCR en deux étapes. La première PCR a permis d'amplifier le gène y compris une portion de la séquence 3' non codante du gène, la seconde PCR a ensuite permis d'amplifier la séquence codante en utilisant des amorces compatibles avec le système Gateway
35 (Invitrogen)

La première PCR a été réalisée sur 2 µl d'ADNc avec une amorce sens BS10 de séquence 5'-AGG CCC GTG ACA CCC ATG AGT-3' s'hybridant spécifiquement dans la région 5' non codante du gène 3-OST porcin et une amorce BS30 anti-sens de séquence 5'-CAC CTA GTG TAC ACC ACA ATT TAC-3' s'hybridant de
40 façon spécifique en 3' au niveau de l'UTR. 35 cycles thermiques ont été appliqués (10 sec de dénaturation à 98°C, 30 sec d'hybridation à 64°C et 150 sec d'élongation à 68°C)

45 Une seconde PCR est ensuite réalisée sur 1 µl du produit PCR afin d'amplifier spécifiquement la phase codante. Pour cela, nous utilisons l'amorce sens BS31 de séquence **SEQ ID N°18** 5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC AGC ATG GCC GCG CTG CTC 3' et l'amorce anti-sens BS32 de séquence **SEQ ID N°19** 5' GGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG TTT AGT GCC AGT

CAA ATG TTC TGC C^{3'}. Le programme PCR utilisé est identique à celui utilisé pour la première PCR.

Le produit PCR de 1 kb a ensuite été cloné d'après la procédure du kit Gateway cloning technology, Invitrogen dans le vecteur épisomal pE-IRES-neo2. La

5 séquence du gène porcin a été vérifiée par séquençage.

La séquence nucléotidique obtenue est la séquence SEQ IDN°4. La séquence protéique déduite est la séquence **SEQ IDN°5**.

10 **EXEMPLE 6: Identification de la séquence complète codante du gène 6-OST porcin**

La séquence partielle du gène porcin (nucléotide 682 à 910 de la séquence humaine) codant pour la 6-OST est disponible dans une banque EST (GenBank

15 accession number BE235545)

La séquence codante complète du gène 6-OST a été identifiée en combinant deux expériences de RT-PCR avec des expériences de 5' et 3'-RACE en utilisant comme source d'ARN, des ARN de foie de porc isolés d'après le protocole du kit

20 Trizol (Invitrogen)

La transcription inverse de 80 ng d'ARN totaux en ADNc a été effectuée en suivant le protocole du kit First Strand Synthesis Sytem (Invitrogen), en utilisant comme amorce un oligonucléotide dT24.

25 2 µl de ces ADNc ont ensuite été amplifiés par PCR en présence d'une amorce sens 386-03 de séquence **SEQ ID N°20** 5'-AGA TGA CTG GTC GGG CTG C-3' et d'une amorce anti-sens 386-01 de séquence **SEQ ID N°21** 5'-CAA TGA TRT GGC TCA TGT AGT CC-3' avec la KOD hot start Polymerase (Novagen). Après les 35 cycles thermiques (15 sec de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation à 60°C et

30 2 min d'élongation à 68°C), le fragment amplifié de 537 pb a été cloné dans le vecteur pCR-Blunt II TOPO (Invitrogen, Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit) puis séquencé.

La séquence de ce fragment a été utilisée pour générer trois amorces 386-05, 386-19 et 386-20 utilisées pour la prochaine PCR et le 3'-RACE.

35 2 µl des ADNc obtenus précédemment ont été amplifiés par PCR en présence d'une amorce sens 386-07 de séquence **SEQ ID N°22** 5'-ATG GTT GAG CGC GCC AGC AAG TTC G-3' et de l'amorce anti-sens 386-05 de séquence **SEQ ID N°23** 5'-GGT TAT TGG CCA GGT TGT AGG GGC-3' avec la KOD hot start Polymerase (Novagen). Après les 30 cycles thermiques (15 sec de dénaturation à

40 95°C, 30 sec d'hybridation à 60°C et 1 min d'élongation à 68°C), le fragment amplifié de 718 pb a été cloné dans le vecteur pCR-Blunt II TOPO (Invitrogen, Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit) puis séquencé.

45 La séquence de ce fragment a été utilisée pour générer deux amorces 386-24, 386-26 utilisées pour le 5'-RACE.

Dans le cadre du 3'-RACE, 1 µl d'ARN porcin de foie a été reverse transcript en ADNc d'après le protocole du kit First Strand Synthesis Sytem de Invitrogen, en

utilisant comme amorce l'oligodT CDS-C de séquence **SEQ ID N°24** 5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG T₃₀ VC-3'.

La région 3' du gène codant pour la 6-OST a été ensuite amplifiée par 2 PCR successives. La première PCR a été réalisée sur 2 µl d'ADNc, obtenu précédemment, avec l'amorce sens 386-19 de séquence **SEQ ID N°25** 5'-GGA CCT CTT CCA GCA GCG-3' et l'amorce anti-sens CDS-C avec l'Advantage 2 polymerase mix (Clontech). 24 cycles thermiques ont été appliqués (7 sec de dénaturation à 98°C, 10 sec d'hybridation à 62°C et 2 min d'élongation à 68°C). Une seconde PCR a ensuite été réalisée sur 2 µl de produit issu de la première PCR en utilisant l'amorce sens 386-20 de séquence **SEQ ID N°26** 5'-GCT ATC AGT ACA AGC GGC AGC -3' et l'amorce anti-sens CDS-C. Après les 30 cycles thermiques (7 sec de dénaturation à 95°C, 10 sec d'hybridation à 62°C et 2 min d'élongation à 68°C), le fragment amplifié de 300 pb a été cloné dans le vecteur pCR-Blunt II TOPO (Invitrogen, Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit) puis séquencé. Cette expérience a permis d'identifier la région 3' codante pour la 6-OST et environ 32 pb de la région non codante.

Dans le cadre du 5'-RACE, 2 µl d'ARN porcin de foie a été reverse transcript en ADNc d'après le protocole du kit First Strand Synthesis System de Invitrogen, en utilisant comme amorce l'oligonucléotide 386-28 de séquence **SEQ ID N°27** 5'-CCA GGC TCA GCC CCG G-3'.

L'oligonucléotide okib57 phosphorylé de séquence **SEQ ID N°28** 5'-p GTA GGA ATT CGG GTT GTA GGG AGG TCG ACA TTG CC-3' a été greffé en 5' de l'ADNc par ligation (RNA ligase, Roche).

La région 5' du gène codant pour la 6-OST a été ensuite amplifiée par 2 PCR successives. La première PCR a été réalisée sur 2 µl d'ADNc greffé, avec l'amorce sens okib58 de séquence **SEQ ID N°29** 5'-GGC AAT GTC GAC CTC CCT ACA AC-3' s'hybridant sur l'amorce okib57 et l'amorce anti-sens 386-24 de séquence **SEQ ID N°30** 5'-TCA GCC CCG GGC CCG CG-3' d'après le protocole du kit Advantage 2 polymerase mix. 24 cycles thermiques ont été appliqués (10 sec de dénaturation à 98°C, 10 sec d'hybridation à 64°C et 2 min d'élongation à 72°C). Une seconde PCR a ensuite été réalisée sur 0,5 µl de produit issu de la première PCR en utilisant l'amorce sens okib59 de séquence **SEQ ID N°31** 5'-CTC CCT ACA ACC CGA ATT CCT AC-3' et l'amorce anti-sens 386-26 de séquence **SEQ ID N°32** 5'-GCC CGC GTA CTG GTA GAG G-3'. Après les 40 cycles thermiques (10 sec de dénaturation à 98°C, 10 sec d'hybridation à 66°C et 2 min d'élongation à 72°C), le fragment amplifié de 170 pb a été séquencé. Cette expérience a permis d'identifier la région 5' codante pour la 6-OST et environ 14 pb de la région non codante.

Isolement de la phase codante complète du gène 6-OST porcin.

Afin de cloner la phase codante complète de la 6-OST porcine, une nouvelle expérience de RT-PCR a été réalisée en utilisant les informations obtenues dans la première étape.

La source d'ARN est la même que dans l'étape précédente.

2 µg d'ARN ont été reverse transcript en ADNc d'après le protocole du kit First Strand Synthesis System, en utilisant comme amorce l'oligonucléotide dT CDSIII.

Le gène codant pour la 6-OST a été ensuite amplifié par PCR en utilisant des amorces compatibles avec le système Gateway (Invitrogen) La PCR a été réalisée sur 2 µl d'ADNc avec une amorce sens 386-33 de séquence **SEQ ID N°33** 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AGG ACA ATG GTG ACA CAT GCG GCG GC-3' et une amorce anti-sens 386-34 de séquence **SEQ ID N°34** 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTA CCA CTT CTC GAT GAT GTG GCT C-3'. 35 cycles thermiques ont été appliqués (5 sec de dénaturation à 98°C, 20 sec d'hybridation à 66°C et 1 min 30 sec d'élongation à 72°C)

Le produit PCR de 1 kb a ensuite été cloné d'après la procédure du kit Gateway cloning technology, Invitrogen dans le vecteur épisomal pE-IRES-neo2. La séquence du gène porcin a été vérifiée par séquençage.

La séquence nucléotidique obtenue est la séquence SEQ ID N°6. La séquence protéique déduite est la séquence SEQ ID N°7.

EXEMPLE 7: Transformation des lignées selon l'invention par le gène c-kit porcin

Afin d'obtenir des mastocytes de porc dont la croissance serait indépendante du SCF à long terme, les mastocytes peuvent être transformés avec le gène c-kit muté.

Pour cela, on peut utiliser le gène c-kit préférentiellement porcin portant une mutation ponctuelle responsable de la modification de la valine 556 en glycine (gène noté c-kit^{G556}), cette mutation est analogue aux mutants c-kit^{G559} chez la souris et c-kit^{G560} chez l'homme. Alternativement, on peut aussi utiliser le gène c-kit délété au niveau des acides aminés TQLPYDH 570 à 576, chez la souris cette délétion est analogue aux acides aminés 573 à 579, chez l'homme 574-580. De même, du fait de la conservation inter espèce du gène c-kit, les gènes murins, humains, bovins ou tout autre gène possédant au moins 80 % d'homologie avec le gène porcin peuvent être utilisés. Dans ce cas, il est alors aussi possible d'utiliser une mutation ponctuelle responsable de la modification de l'acide aspartique en valine 814 ou 816 respectivement chez la souris et chez l'homme.

Les mastocytes sont transfectés par une des méthodes décrites dans l'exemple 4, préférentiellement la nucléoporation, avec un vecteur intégratif dans lequel la phase codante du gène c-kit muté est cloné sous le contrôle d'un promoteur fort viral (CMV, RSV) ou cellulaire (EF1α). En plus du gène c-kit muté, ce vecteur peut être aussi porteur d'un gène codant pour une résistance à un antibiotique (généticine, hygromycine, puromycine, etc)

48 heures après la transfection, les cellules sont comptées, centrifugées etensemencées à 2.10^5 C/ml dans le milieu de culture complet supplémenté avec l'antibiotique de sélection. Les cellules sont cultivées en présence de sélection pendant 2 à 3 semaines ce qui permet d'éliminer les cellules qui ne sont pas transfectées de manière stable. Après cette période de sélection, les cellules sont amplifiées.



Les cellules sont alors analysées génétiquement par PCR et RT-PCR afin de vérifier l'intégration du gène c-kit muté et son expression. L'indépendance de ces cellules vis à vis du SCF est mise en évidence par la comparaison de la croissance des cellules transfectées avec le gène c-kit muté dans un milieu sans SCF avec la croissance des cellules transfectées avec le vecteur vide dans un milieu avec et sans SCF.

Une variante à ce protocole consiste à utiliser un vecteur portant seulement le gène c-kit muté. Dans ce cas, les cellules sont sélectionnées 48 heures après la transfection sans utilisation d'agent de sélection mais en ensemencant les cellules à 2.10^5 C/ml dans un milieu dépourvu de SCF. Les cellules non transfectées ne sont pas capables de croître dans un milieu dépourvu en SCF contrairement aux cellules transfectées.

EXEMPLE 8: Transfection des lignées selon l'invention par le gène 3OST porcin.

Afin d'augmenter l'activité biologique des composés de type héparine issus des cultures de mastocytes, il est possible de surexprimer de façon stable le gène codant pour la 3-OST-1 (3 O-sulfatase-1)

Pour cela, on peut utiliser le gène porcin. Alternativement, il est possible d'utiliser des gènes d'autres espèces codant pour l'expression de l'activité 3-O Sulfatase et présentant au moins 80% d'homologie avec le gène porcin notamment la 3-OST-1 murine.

Les mastocytes sont transfectés par la méthode de nucléoporation décrite dans l'exemple 4, avec un plasmide intégratif dans lequel la phase codante du gène 3-OST a été clonée sous le contrôle d'un promoteur fort viral (CMV, RSV) ou cellulaire (EF1 α) En plus du gène 3-OST, ce plasmide porte un gène codant pour une résistance à un antibiotique (génélicine, hygromycine, puromycine, etc).

48 heures après la transfection, les cellules sont comptées, centrifugées et ensemencées à 2.10^5 C/ml dans le milieu de culture complet supplémenté avec l'antibiotique de sélection. Les cellules sont cultivées en présence de sélection pendant 2 à 3 semaines ce qui permet d'éliminer les cellules qui ne sont pas transfectées de manière stable. Après cette période de sélection, les cellules sont amplifiées.

Ces cellules sont analysées génétiquement par PCR et RT-PCR afin de vérifier l'intégration du gène c-kit muté et son expression.

La fonctionnalité de la 3-OST est mise en évidence par des analyses HPLC de l'héparine produite par les mastocytes comparativement avec celle produite par les mastocytes non transfectés. Des analyses de l'activité biologique du produit permettent de confirmer l'augmentation de l'activité biologique vis à vis du facteur Xa et IIa .

Tableau 2: Analyse HPLC des disaccharides obtenus à partir des cultures isolés après 15 semaines.

Disaccharides%	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	Reference Héparine standard
IVs	12.9	8.6	9.9	10.1	10.5	9.8	6.6	7.6	4.1
IIa	3.9	4.0	4.7	3.9	3.9	4.1	4.2	2.9	4.0
IIIa	0.7	2.2	1.2	2.9	0.9	2.4	0.5	1.6	1.1
IIs	16.3	8.5	18.2	7.6	16.7	8.0	17.4	8.0	10.6
IIIs	12.4	23.7	14.0	26.8	12.2	26.2	13.2	24.6	6.4
Ia	0.3	0.4	0.8	0.5	0.5	0.5	0.4	0.4	1.4
Is	53.6	52.6	51.2	48.2	55.2	49.0	57.7	54.8	55.9
Sulfates/carboxylates	2.36	2.38	2.35	2.31	2.40	2.33	2.46	2.43	2.38
µg/10 ⁶ cellules	3.3	9.4	0.9	14.3	1.6	9.4	2.3	8.6	

Tableau 3: Productivité et profil disaccharidique de lignées de mastocytes en culture pour différentes espèces

% disaccharides	Mastocytes Porcin	MST Mastocytes Murins	HMC1 Mastocytes Humains	Heparin Standard
IV-a	4,8	7,7	7,2	5,4
IV-s	6,6	8,3	0,0	3,6
II-a	5,9	8,2	3,8	4,0
III-a	0,7	4,4		1,2
II-s	17,9	19,7	16,2	10,8
III-s	9,0	7,6	2,1	6,4
I-a	0,6		0,7	1,4
I-s	54,4	40,3	41,0	57,0
Masse d'héparine par 106 cellules	2,6 µg	0,11 µg	0,05 µg	

Tableau 4 : Profil disaccharidique en cours de culture (J0 à J10) condition de culture C1

% Disaccharides	J0/C1	J4/C1	J7/C1	J10/C1	référence
IV-a	4,8	4,4	4,8	4,9	5,4
IV-s	5,7	7,2	6,8	6,6	3,6
II-a	5,0	6,3	5,9	5,6	4,0
III-a	0,6	0,5	0,7	0,9	1,2
II-s	17,1	17,1	16,6	16,7	10,8
III-s	7,3	7,4	8,6	9,2	6,4
I-a	0,4	0,5	0,7	0,7	1,4
I-s	59,2	56,6	55,9	55,4	57,0
héparine /10 ⁶ cellules (en µg)	2,4	2,1	2,4	2,1	

REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé d'obtention de cultures ou de lignées de mastocytes comprenant la mise en culture d'une population de cellules souches de moelle osseuse de jeunes porcs ou de fœtus, dans un milieu comprenant au moins environ 0,2 ng/ml d'IL-3, au moins environ 8 ng/ml de SCF et au moins environ 0,1 ng/ml d'IL-4, 10 ng/ml d'IL-6 et/ou 1 ng/ml de G-CSF.
- 10 2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les porcs ont entre environ 2 jours et environ 6 semaines.
3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les cellules sont maintenues dans le milieu pendant au moins environ 30 jours.
- 15 4. Culture ou lignée de mastocytes porcins susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 1 à 3.
- 20 5. Culture ou lignée de mastocytes porcins caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine dans lesquelles les quantités en disacharides Is sont supérieures aux quantités en disacharides IIs, les quantités en disacharides IIs sont supérieures aux quantités en disacharides IIIs, et les quantités en disacharides IIIs sont supérieures aux quantités en disacharides IVs,
- 25 6. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine présentant des rapports entre les disacharides Is, IIs, IIIs et IVs proches de ceux de l'héparine.
- 30 7. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine comprenant au moins 30% de disacharides Is.
- 35 8. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine présentant un rapport entre les disacharides IIs et IIIs proche de celui de l'héparine.
- 40 9. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine présentant un rapport entre les disacharides IIs et IIIs compris entre 0,5 et 5.
- 45 10. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit, au moins 0,1 µg de molécules de type héparine/10⁶ cellules.
11. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine

REVENDEICATIONS

- 5 1. Procédé d'obtention de cultures ou de lignées de mastocytes comprenant la mise en culture d'une population de cellules souches de moelle osseuse de jeunes porcs ou de fœtus, dans un milieu comprenant au moins environ 0,2 ng/ml d'IL-3, au moins environ 8 ng/ml de SCF et au moins environ 0,1 ng/ml d'IL-4, 10 ng/ml d'IL-6 et/ou 1 ng/ml de G-CSF.
- 10 2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les porcs ont entre environ 2 jours et environ 6 semaines.
- 15 3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les cellules sont maintenues dans le milieu pendant au moins environ 30 jours.
- 20 4. Culture ou lignée de mastocytes porcins susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 1 à 3.
- 25 5. Culture ou lignée de mastocytes porcins susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine dans lesquelles les quantités en disacharides Is sont supérieures aux quantités en disacharides IIs, les quantités en disacharides IIs sont supérieures aux quantités en disacharides IIIs, et les quantités en disacharides IIIs sont supérieures aux quantités en disacharides IVs,
- 30 6. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine présentant des rapports entre les disacharides Is, IIs, IIIs et IVs proches de ceux de l'héparine.
- 35 7. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine comprenant au moins 30% de disacharides Is.
- 40 8. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine présentant un rapport entre les disacharides IIs et IIIs proche de celui de l'héparine.
- 45 9. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine présentant un rapport entre les disacharides IIs et IIIs compris entre 1,3 et 1,9.

présentant un rapport entre les disaccharides Is et IIs compris entre environ 3 et 8.

- 5 12. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine présentant une activité anti-Xa supérieure à au moins 10 UI/mg.
- 10 13. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine présentant une activité anti IIa supérieure à au moins 10 UI/mg.
14. Lignée de mastocytes porcins déposée auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur le 09 Avril 2003 sous le n° I-3010
- 15 15. Lignée de mastocytes porcins déposée auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur le 09 Avril 2003 sous le n° I-3011
16. Lignée de mastocytes porcins déposée auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur le 09 avril 2003 sous le n° I-3012
- 20 17. Lignée de mastocytes porcins déposée auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur le 09 avril 2003 sous le n° I-3013.
18. Lignée de mastocytes porcins déposée auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur le 09 avril 2003 sous le n° I-3014
- 25 19. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 8 caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique codant une protéine immortalisante.
- 30 20. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 8 caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique codant le c-kit.
21. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique codant l'antigène T.
- 35 22. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique codant une enzyme agissant sur la sulfatation des de molécules de type héparine.
- 40 23. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique codant une 3-OST.
- 45 24. Procédé de production de molécules de type héparine comprenant la mise en culture de cultures ou lignées de mastocytes porcins selon l'une des revendications 1 à 23.
25. Procédé de production de molécules de type héparine comprenant la mise en culture, dans un milieu adapté, de cultures ou lignées de mastocytes

10. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit, au moins 0,1 μg de molécules de type héparine/ 10^6 cellules.
- 5 11. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine présentant un rapport entre les disacharides Is et IIs compris entre environ 3 et 8.
- 10 12. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine présentant une activité anti-Xa supérieure à au moins 10 UI/mg.
- 15 13. Culture ou lignée de mastocytes porcins selon la revendication 5 caractérisée en ce qu'elle produit des molécules de type héparine présentant une activité anti Ila supérieure à au moins 10 UI/mg.
- 20 14. Lignée de mastocytes porcins obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 3 déposée auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur le 09 Avril 2003 sous le n° I-3010
- 25 15. Lignée de mastocytes porcins obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 3 déposée auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur le 09 Avril 2003 sous le n° I-3011
- 30 16. Lignée de mastocytes porcins obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 3 déposée auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur le 09 avril 2003 sous le n° I-3012
- 35 17. Lignée de mastocytes porcins obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 3 déposée auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur le 09 avril 2003 sous le n° I-3013.
- 40 18. Lignée de mastocytes porcins obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 3 déposée auprès de la Collection de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur le 09 avril 2003 sous le n° I-3014
- 45 19. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisée en ce qu'elle est comprend un acide nucléique codant une protéine immortalisante.
20. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique codant le c-kit.

porcins dans un milieu de culture comprenant au moins environ 0,1 ng/ml d'IL-4.

5 26. Procédé de production de molécules de type héparine comprenant l'obtention de cultures ou lignées de mastocytes porcins surexprimant l'IL4, et la mise en culture des ces cellules dans un milieu de culture adapté.

10 27. Procédé de production de molécules de type héparine comprenant l'obtention de cultures ou lignées de mastocytes porcins transfectés par un acide nucléique codant pour l'IL4, et la mise en culture des ces cellules dans un milieu de culture adapté.

15 28. Protéine d'origine porcine de type c-kit caractérisée en ce qu'elle présente une extrémité C-terminale ayant la séquence SEQ ID N°3.

29. Protéine selon la revendication 28 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence présentant une identité d'au moins 99% avec la séquence SEQ ID N°2.

20 30. Acide nucléique comprenant une séquence codant une protéine selon l'une des revendications 28 et 29.

25 31. Acide nucléique selon la revendication 30 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 99% avec la séquence SEQ ID N°1.

32. Protéine d'origine porcine présentant une activité 3 –O-sulfatase.

30 33. Protéine selon la revendication 32 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence présentant une identité d'au moins 95% avec la séquence SEQ ID N°4.

35 34. Acide nucléique comprenant une séquence codant une protéine selon l'une des revendications 32 et 33.

35 35. Acide nucléique selon la revendication 34 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 95% avec la séquence SEQ ID N°5.

40 36. Protéine d'origine porcine présentant une activité 6 –O-sulfatase.

45 37. Protéine selon la revendication 36 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence présentant une identité d'au moins 90% avec la séquence SEQ ID N°6.

38. Acide nucléique comprenant une séquence codant une protéine selon l'une des revendications 36 et 37.

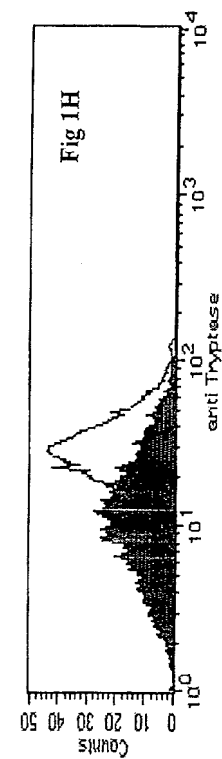
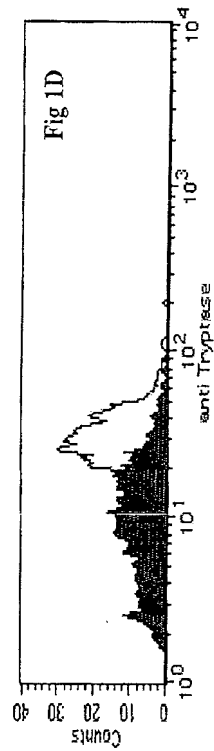
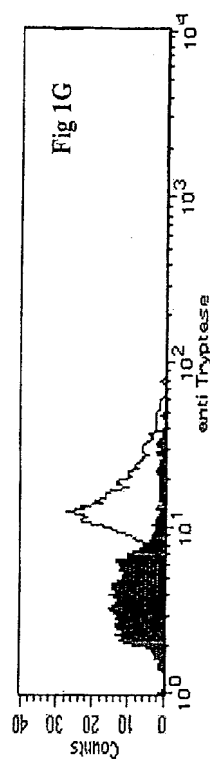
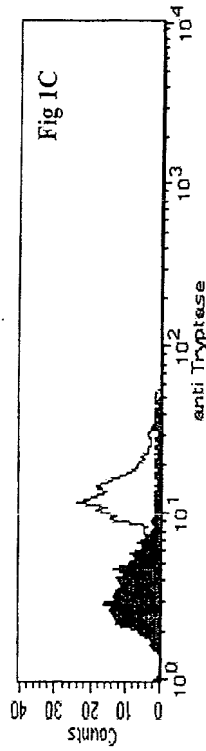
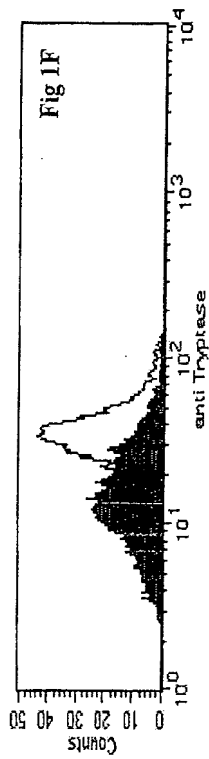
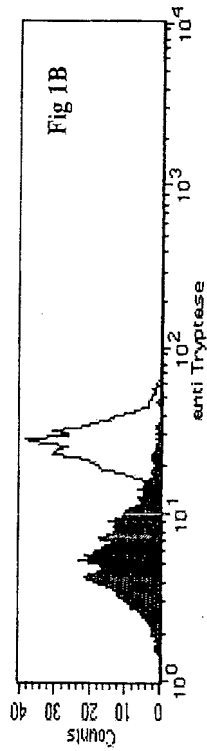
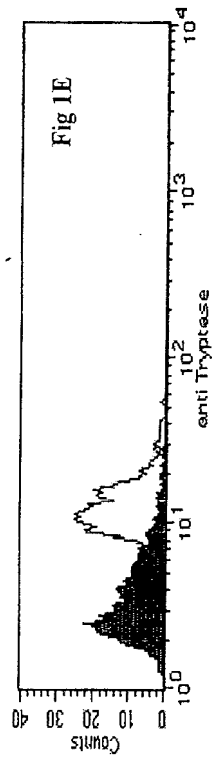
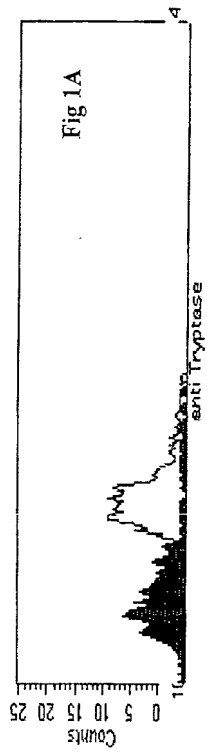
21. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique codant l'antigène T.
- 5 22. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique codant une enzyme agissant sur la sulfatation des molécules de type héparine.
- 10 23. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique codant une 3-OST.
- 15 24. Procédé de production de molécules de type héparine comprenant la mise en culture de cultures ou lignées de mastocytes porcins selon l'une des revendications 4 à 23, ou obtenues selon l'une des revendications 1 à 3.
- 20 25. Procédé de production de molécules de type héparine comprenant la mise en culture, dans un milieu adapté, de cultures ou lignées de mastocytes porcins dans un milieu de culture comprenant au moins environ 0,1 ng/ml d'IL-4.
- 25 26. Procédé de production de molécules de type héparine comprenant l'obtention de cultures ou lignées de mastocytes porcins surexprimant l'IL4, et la mise en culture des ces cellules dans un milieu de culture adapté.
- 30 27. Procédé de production de molécules de type héparine comprenant l'obtention de cultures ou lignées de mastocytes porcins transfectés par un acide nucléique codant pour l'IL4, et la mise en culture des ces cellules dans un milieu de culture adapté.
- 35 28. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisée en ce qu'elle exprime une protéine d'origine porcine de type c-kit.
- 40 29. Culture ou lignée selon la revendication 28 caractérisée en ce que la protéine d'origine porcine de type c-kit présente une extrémité C-terminale ayant la séquence SEQ ID N°3.
- 45 30. Culture ou lignée selon la revendication 28 caractérisée en ce que la protéine d'origine porcine présente une identité d'au moins 99% avec la séquence SEQ ID N°2.
31. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisée en ce qu'elle exprime une protéine d'origine porcine présentant une activité 3-O-sulfatase.

39. Acide nucléique selon la revendication 38 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 95% avec la séquence SEQ ID N°7.
- 5 40. Cellule comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 30, 31, 34, 35, 38 et 39.
- 10 41. Cellule exprimant une protéine selon l'une des revendications 28, 29, 32, 33, 36 et 37.

32. Culture ou lignée selon la revendication 31 caractérisée en ce que la protéine d'origine porcine présente une identité d'au moins 95% avec la séquence SEQ ID N°4.
- 5 33. Culture ou lignée selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisée en ce qu'elle exprime une protéine d'origine porcine présentant une activité 6 -O-sulfatase.
- 10 34. Culture ou lignée selon la revendication 33 caractérisée en ce que la protéine d'origine porcine présente une identité d'au moins 90% avec la séquence SEQ ID N°6.

1/7

Control ☐ Marquage spécifique



2/7

Non marqué control Marquage spécifique

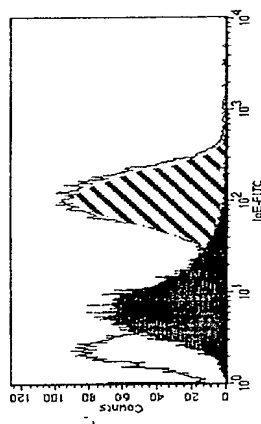


Fig 2A

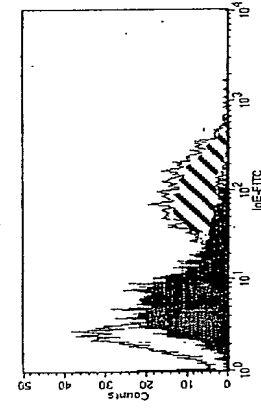


Fig 2B

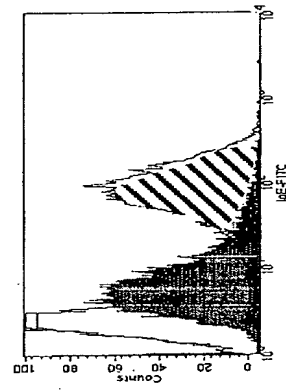


Fig 2C

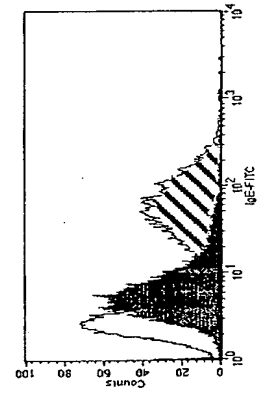


Fig 2D

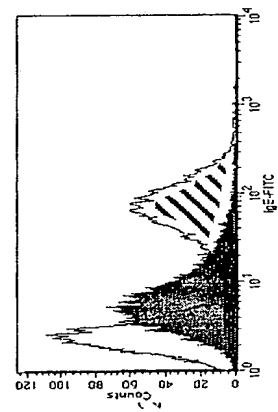


Fig 2E

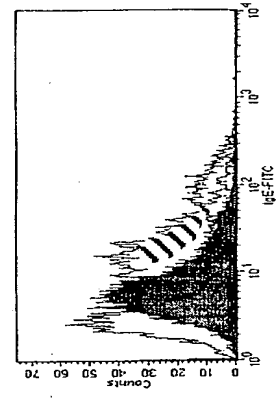


Fig 2F

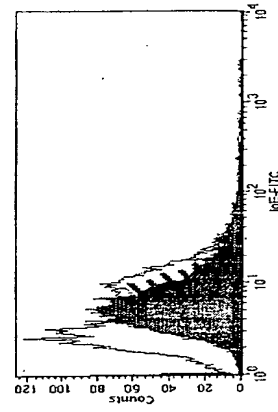


Fig 2G

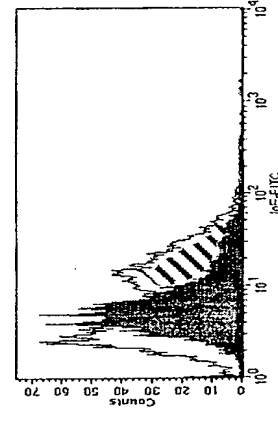


Fig 2H

3/7

control Marquage spécifique

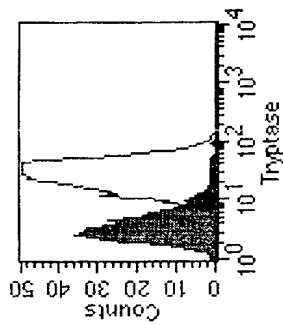


Fig 3A

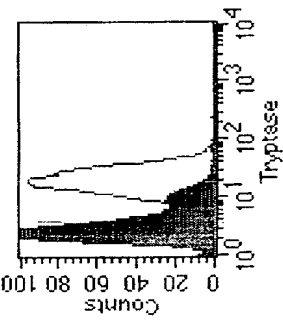


Fig 3B

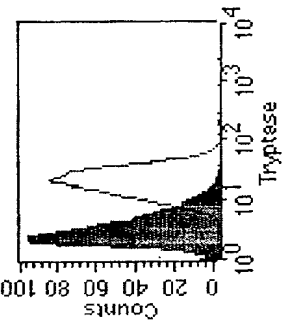


Fig 3C

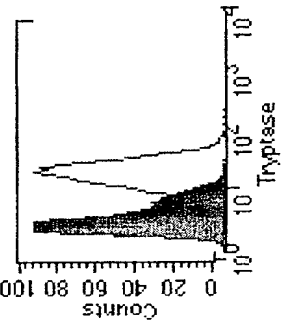


Fig 3D

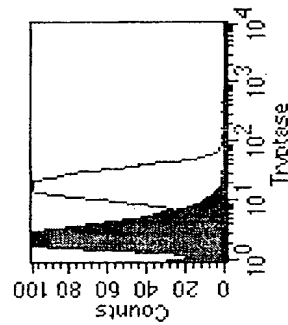


Fig 3E

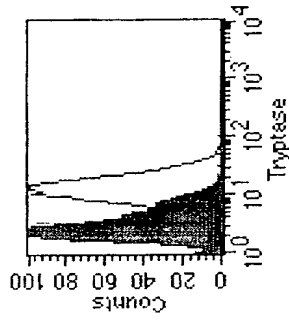


Fig 3F

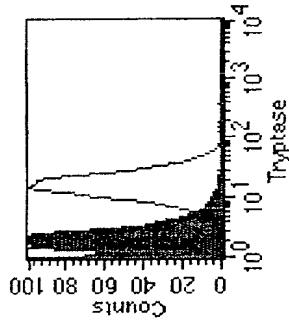


Fig 3G

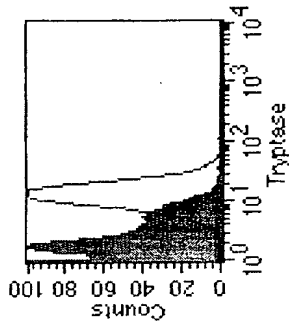


Fig 3H

4/7

control Marquage spécifique

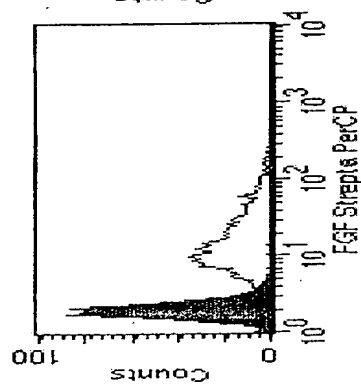


Fig 4A

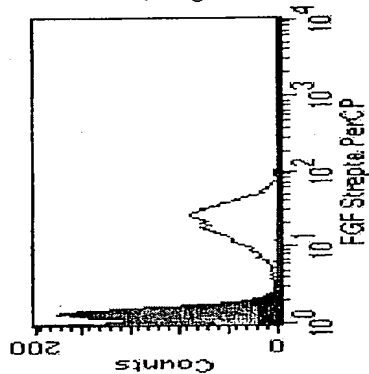


Fig 4B

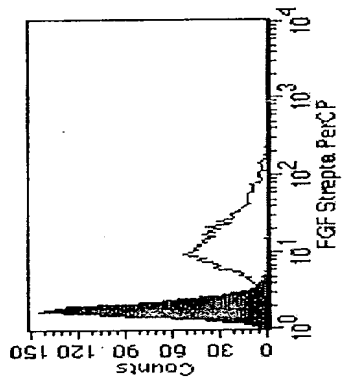


Fig 4C

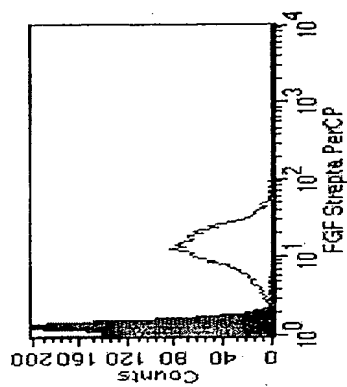


Fig 4D

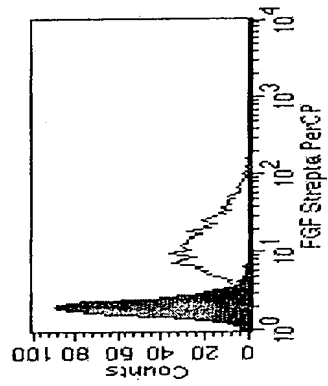


Fig 4E

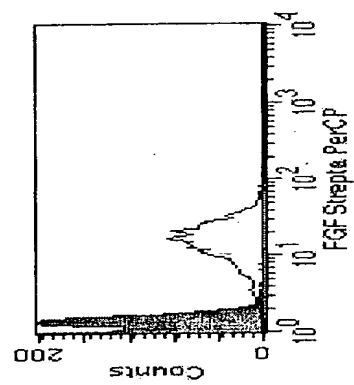


Fig 4F

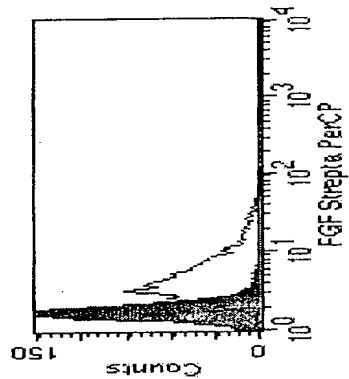


Fig 4G

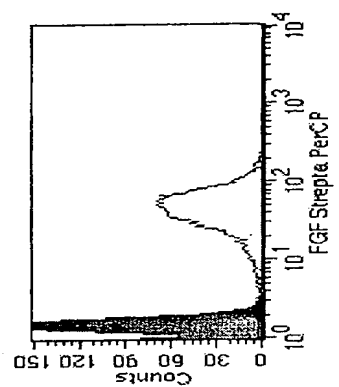


Fig 4H

5/7

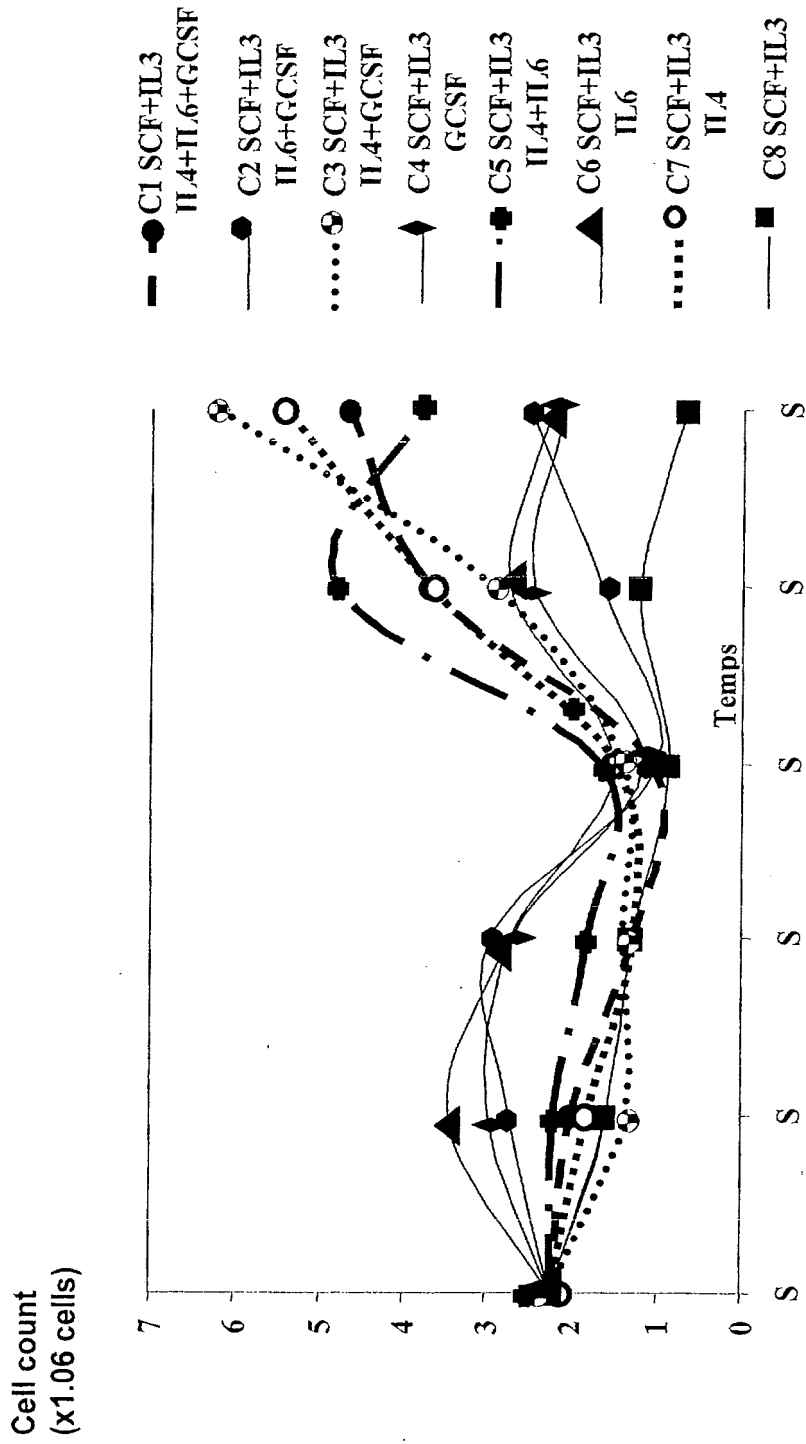
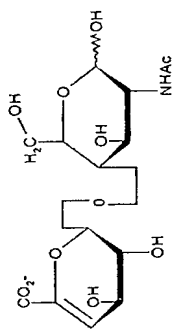
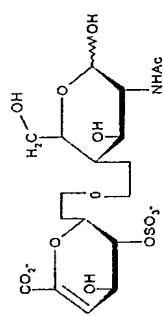


Figure 5

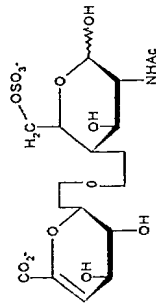
6/7



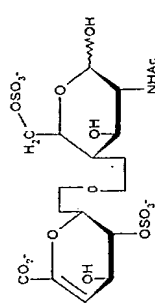
ΔIVa



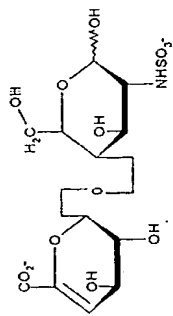
ΔIIIa



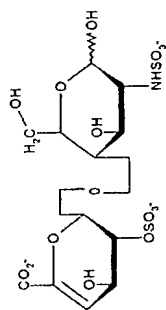
ΔIIa



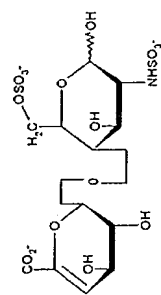
ΔIa



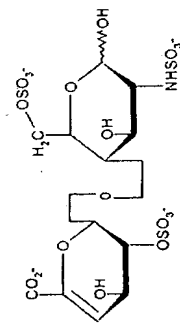
ΔIVs



ΔIIIs



ΔIIIs



ΔIs

Figure 6

7/7

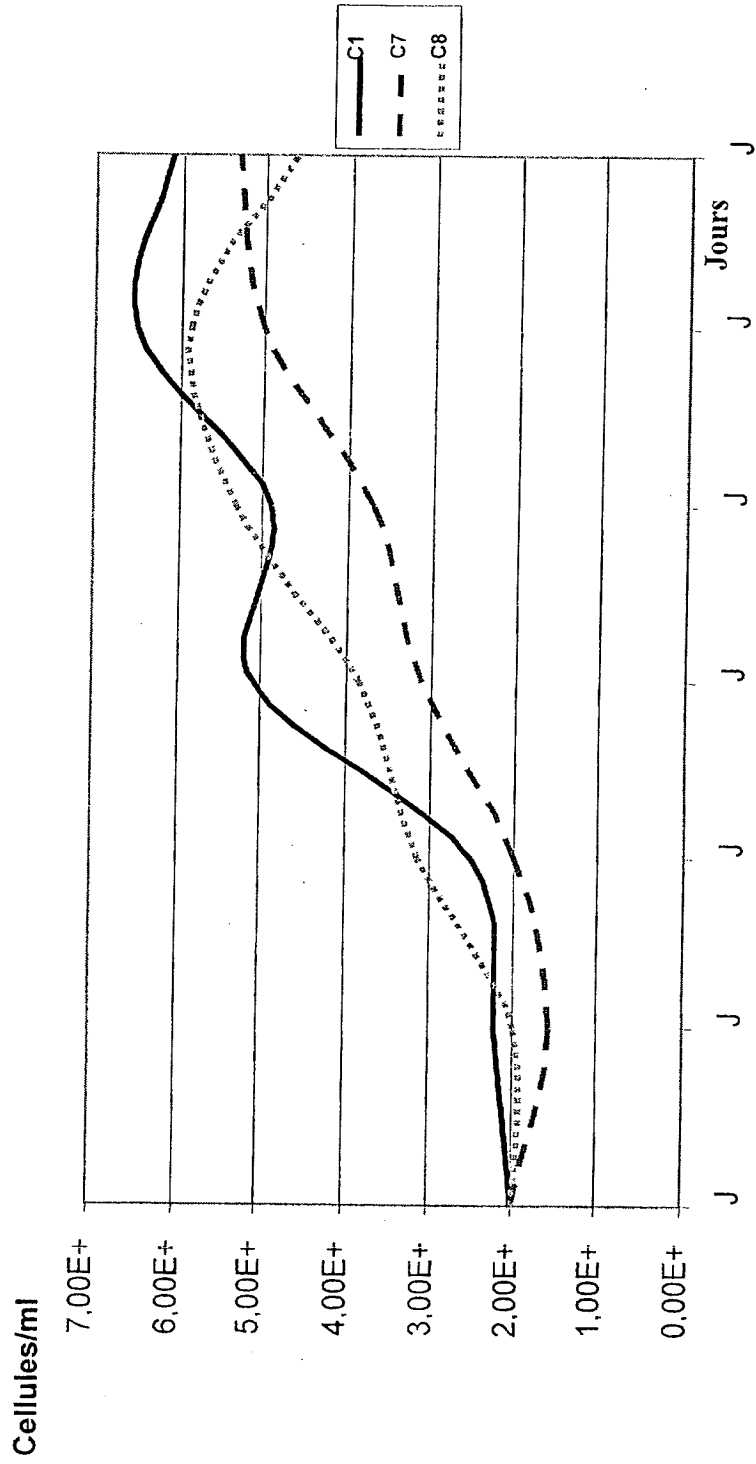


Figure 7

LISTE DE SEQUENCES

<110> AVENTIS PHARMA SA

<120> Procédé d'obtention de lignées de mastocytes

<130> MASTOCYTES

<140>

<141>

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3952

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<220>

<221> CDS

<222> (118)..(3036)

<400> 1

attgggccga cgtcgcatgc tcccggccgg ccgcatntc ngccgcggga aattcgattg 60

gaattcctcg agagcaggaa cgtggaaagg agtccggtc ccagagcagc caccgcg 117

atg aga ggc gct cgc cgc gcc tgg gat ttt ctc ttc gtc ctg cag ctc 165
 Met Arg Gly Ala Arg Arg Ala Trp Asp Phe Leu Phe Val Leu Gln Leu
 1 5 10 15

ttg ott cgc gtc cag aca ggc tct tct cag cca tct gtg agt cca gag 213
 Leu Leu Arg Val Gln Thr Gly Ser Ser Gln Pro Ser Val Ser Pro Glu
 20 25 30

gaa ctg tct cca cca tcc atc cag cca gca aaa tca gag tta atc gtc 261
 Glu Leu Ser Pro Pro Ser Ile Gln Pro Ala Lys Ser Glu Leu Ile Val
 35 40 45

agt gct ggc gat gag att agg ctg ttc tgc acc gat cca gga tct gtc 309
 Ser Ala Gly Asp Glu Ile Arg Leu Phe Cys Thr Asp Pro Gly Ser Val
 50 55 60

aaa tgg act ttt gag acc ctg ggt cag ctg agt gag aat act cac gca 357
 Lys Trp Thr Phe Glu Thr Leu Gly Gln Leu Ser Glu Asn Thr His Ala
 65 70 75 80

gag tgg atc gtg gag aaa gca gag gcc atg aat aca ggc aat tat aca	405
Glu Trp Ile Val Glu Lys Ala Glu Ala Met Asn Thr Gly Asn Tyr Thr	
85 90 95	
tgc acc aat gaa ggc ggt tta agc agt tcc att tat gtg ttt gtt aga	453
Cys Thr Asn Glu Gly Gly Leu Ser Ser Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg	
100 105 110	
gat cct gag aag ctt ttc ctc gtc gac cct ccc ttg tat ggg aag gag	501
Asp Pro Glu Lys Leu Phe Leu Val Asp Pro Pro Leu Tyr Gly Lys Glu	
115 120 125	
gac aat gac gcg ctg gtc cgc tgt cct ctg acg gac cca gag gtg acc	549
Asp Asn Asp Ala Leu Val Arg Cys Pro Leu Thr Asp Pro Glu Val Thr	
130 135 140	
aat tac tcc ctc acg ggc tgc gag ggg aaa ccc ctt ccc aag gat ttg	597
Asn Tyr Ser Leu Thr Gly Cys Glu Gly Lys Pro Leu Pro Lys Asp Leu	
145 150 155 160	
acc ttc gtt gca gac ccc aag gcc ggc atc acc atc aaa aat gtg aag	645
Thr Phe Val Ala Asp Pro Lys Ala Gly Ile Thr Ile Lys Asn Val Lys	
165 170 175	
cgc gag tat cat cgg ctg tgt cta cac tgc tcc gcc aac cag ggg ggc	693
Arg Glu Tyr His Arg Leu Cys Leu His Cys Ser Ala Asn Gln Gly Gly	
180 185 190	
aag tcc gtg ctg tcg aag aaa ttc acc ctg aaa gtg agg gca gcc atc	741
Lys Ser Val Leu Ser Lys Lys Phe Thr Leu Lys Val Arg Ala Ala Ile	
195 200 205	
aga gct gta cct gtt gtg gct gtg tcc aaa gca agc tac ctt ctc agg	789
Arg Ala Val Pro Val Val Ala Val Ser Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg	
210 215 220	
gaa ggg gag gaa ttt gcc gtg atg tgc ttg atc aaa gac gtg tct agt	837
Glu Gly Glu Glu Phe Ala Val Met Cys Leu Ile Lys Asp Val Ser Ser	
225 230 235 240	
tcc gtg gac tcc atg tgg atc agg gag aac agc cag act aaa gca cag	885
Ser Val Asp Ser Met Trp Ile Arg Glu Asn Ser Gln Thr Lys Ala Gln	
245 250 255	
gtg aag agg aat agc tgg cat cag ggt gac ttc aat ttt ctg cgg cag	933
Val Lys Arg Asn Ser Trp His Gln Gly Asp Phe Asn Phe Leu Arg Gln	
260 265 270	

gaa agg ctg aca atc agc tca gca aga gtt aat gat tct ggc gtg ttc	981
Glu Arg Leu Thr Ile Ser Ser Ala Arg Val Asn Asp Ser Gly Val Phe	
275 280 285	
atg tgt tac gcc aat aat act ttt gga tct gca aat gtc aca acc acc	1029
Met Cys Tyr Ala Asn Asn Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr	
290 295 300	
tta gaa gta gta gat aaa gga ttc att aat atc ttc cct atg atg aat	1077
Leu Glu Val Val Asp Lys Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Met Met Asn	
305 310 315 320	
acc act gtg ttt gta aac gat gga gag gat gtg gat cta att gtt gag	1125
Thr Thr Val Phe Val Asn Asp Gly Glu Asp Val Asp Leu Ile Val Glu	
325 330 335	
tac gag gcg tac ccc aaa cct gaa cac cga cag tgg ata tat atg aac	1173
Tyr Glu Ala Tyr Pro Lys Pro Glu His Arg Gln Trp Ile Tyr Met Asn	
340 345 350	
cgc act gcc act gat aag tgg gag gat tat ccc aag tct gag aat gaa	1221
Arg Thr Ala Thr Asp Lys Trp Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu	
355 360 365	
agt aac atc aga tat gta agt gaa ctt cac ttg acc aga tta aaa ggg	1269
Ser Asn Ile Arg Tyr Val Ser Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly	
370 375 380	
acc gaa gga ggc act tac aca ttt ctc gtg tcc aat gct gat gtc aat	1317
Thr Glu Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Leu Val Ser Asn Ala Asp Val Asn	
385 390 395 400	
tct tct gtg aca ttt aat gtt tac gtg aac aca aaa cca gaa atc ctg	1365
Ser Ser Val Thr Phe Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu	
405 410 415	
act cat gac agg ctc atg aac ggc atg ctc cag tgt gtg gcg gca ggc	1413
Thr His Asp Arg Leu Met Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly	
420 425 430	
ttc cca gag ccc acc atc gat tgg tat ttc tgt cca ggc acc gag cag	1461
Phe Pro Glu Pro Thr Ile Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln	
435 440 445	
aga tgt tcc gtt ccc gtt ggg cca gtg gac gtg cag atc caa aac tca	1509
Arg Cys Ser Val Pro Val Gly Pro Val Asp Val Gln Ile Gln Asn Ser	
450 455 460	

4

acc att gga ggg ccc acc ctg gtc att aca gaa tat tgt tgc tat ggt 2133
 Thr Ile Gly Gly Pro Thr Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly
 660 665 670

gat ctc ctg aat ttt ttg aga cgg aaa cgt gat tgc ttt att tgc tca 2181
 Asp Leu Leu Asn Phe Leu Arg Arg Lys Arg Asp Ser Phe Ile Cys Ser
 675 680 685

aag cag gaa gat cac gca gaa gcg gcg ctt tat aag aac ctt ctg cat 2229
 Lys Gln Glu Asp His Ala Glu Ala Ala Leu Tyr Lys Asn Leu Leu His
 690 695 700

tca aag gag tct tcc tgc agt gac agt act aac gag tac atg gac atg 2277
 Ser Lys Glu Ser Ser Cys Ser Asp Ser Thr Asn Glu Tyr Met Asp Met
 705 710 715 720

aaa ccc gga gtg tct tat gtg gta cca acc aag gca gac aaa agg aga 2325
 Lys Pro Gly Val Ser Tyr Val Val Pro Thr Lys Ala Asp Lys Arg Arg
 725 730 735

tct gcg aga ata ggc tca tac ata gaa cga gat gtg act cct gcc atc 2373
 Ser Ala Arg Ile Gly Ser Tyr Ile Glu Arg Asp Val Thr Pro Ala Ile
 740 745 750

atg gaa gat gat gag ttg gcc cta gac ctg gag gac ttg ctc agc ttt 2421
 Met Glu Asp Asp Glu Leu Ala Leu Asp Leu Glu Asp Leu Leu Ser Phe
 755 760 765

tct tac caa gtg gca aag ggc atg gcc ttc ctc gcc tgc aag aat tgt 2469
 Ser Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Ala Phe Leu Ala Ser Lys Asn Cys
 770 775 780

att cac aga gac ttg gcg gcc aga aat atc ctc ctt act cat ggt cga 2517
 Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Thr His Gly Arg
 785 790 795 800

atc aca aag att tgt gat ttt ggt cta gcc aga gac atc aag aat gat 2565
 Ile Thr Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Lys Asn Asp
 805 810 815

tct aat tac gtg gtc aaa gga aac gct cgg cta ccc gtg aag tgg atg 2613
 Ser Asn Tyr Val Val Lys Gly Asn Ala Arg Leu Pro Val Lys Trp Met
 820 825 830

gca ccc gag agc att ttc aac tgt gtc tac aca ttt gaa agc gat gtc 2661
 Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asn Cys Val Tyr Thr Phe Glu Ser Asp Val
 835 840 845



tgg tcc tat ggg att ttt ctg tgg gag ctc ttc tct tta ggg agc agc 2709
 Trp Ser Tyr Gly Ile Phe Leu Trp Glu Leu Phe Ser Leu Gly Ser Ser
 850 855 860

ccc tac cct gga atg cca gtt gat tct aaa ttc tac aag atg atc aag 2757
 Pro Tyr Pro Gly Met Pro Val Asp Ser Lys Phe Tyr Lys Met Ile Lys
 865 870 875 880

gag ggt ttc cga atg ctc agt cct gag cat gca cct gcg gaa atg tat 2805
 Glu Gly Phe Arg Met Leu Ser Pro Glu His Ala Pro Ala Glu Met Tyr
 885 890 895

gac atc atg aag act tgc tgg gat gcg gat ccc ctc aaa aga cca acg 2853
 Asp Ile Met Lys Thr Cys Trp Asp Ala Asp Pro Leu Lys Arg Pro Thr
 900 905 910

ttt aag cag att gtg cag ctg att gag aag cag att tcg gag agc acc 2901
 Phe Lys Gln Ile Val Gln Leu Ile Glu Lys Gln Ile Ser Glu Ser Thr
 915 920 925

aat cac att tat tcc aac tta gcg aac tgc agc ccc cac cgg gag aac 2949
 Asn His Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Asn Cys Ser Pro His Arg Glu Asn
 930 935 940

ccc gcg gtg gat cat tct gtg cgg atc aac tcc gtg ggc agc agt gcc 2997
 Pro Ala Val Asp His Ser Val Arg Ile Asn Ser Val Gly Ser Ser Ala
 945 950 955 960

tcc tcc acg cag ccg ctg ctt gtc cac gaa gac gtc tga agcagaatgg 3046
 Ser Ser Thr Gln Pro Leu Leu Val His Glu Asp Val
 965 970

gtgtccgggg tgggggggtgg ggggggtcct ccccccacagc accggcctac tgccattctt 3106

tttggttttc ataatggtta ttttgtttcc ctccaacttg cãtãctactc cagggtagtg 3166

gatgctccgc tgtaatcctc tttacgagca cacttttagtg gccaatgatt tttgtcatca 3226

gctgccattg agctgtatat gttcccaata gcacgctagc ccccat AAC ggagagcatt 3286

cagacttagg gaagaggagg gtaggacggg ctggacaccc caggtccttg acaagtcttc 3346

tccagtttct gtccaataag tgctgtaatg gtttatttga gcacctggct gtogtcaact 3406

ccggtccttg tcatcatctg taacaatatg atgatgatga tgccagaacc taatcccttg 3466

atgtggaaaa taggatgtta atcaaacaaa gggcagaaag aagcctgtga ctatctgggc 3526

tcgagaagtc aagtatttca tgctgggagt aagacgtaag ccatggaaaa atgctctccg 3586
 ggcatgaata aggctgctgg ccatgagcct ttttactcct gacctgggtt ntaagtagtt 3646
 tgttattagg gagctggatc ggaggggaagg cttctgcctg cattttgtat atactcatct 3706
 ataaattggt catgttcaca tatttgaggg gggaaaaccc gcaaggtgta gtttctggat 3766
 acaatcctgg ctcgagtctg ctgcgtgtag aaatagctga agagccagac acgtttgaag 3826
 gaaacagtgc tttttttaag aaaaaaaaaa aaaaaagtcg acatcgatac gcgtgggtcaa 3886
 tcactagtag attcgcggcc gctgcaggt cgaccanaag gagagctccc aacgcgtgga 3946
 gcaagc 3952

<210> 2
 <211> 972
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 2
 Met Arg Gly Ala Arg Arg Ala Trp Asp Phe Leu Phe Val Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Arg Val Gln Thr Gly Ser Ser Gln Pro Ser Val Ser Pro Glu
 20 25 30
 Glu Leu Ser Pro Pro Ser Ile Gln Pro Ala Lys Ser Glu Leu Ile Val
 35 40 45
 Ser Ala Gly Asp Glu Ile Arg Leu Phe Cys Thr Asp Pro Gly Ser Val
 50 55 60
 Lys Trp Thr Phe Glu Thr Leu Gly Gln Leu Ser Glu Asn Thr His Ala
 65 70 75 80
 Glu Trp Ile Val Glu Lys Ala Glu Ala Met Asn Thr Gly Asn Tyr Thr
 85 90 95
 Cys Thr Asn Glu Gly Gly Leu Ser Ser Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg
 100 105 110
 Asp Pro Glu Lys Leu Phe Leu Val Asp Pro Pro Leu Tyr Gly Lys Glu
 115 120 125



Asp Asn Asp Ala Leu Val Arg Cys Pro Leu Thr Asp Pro Glu Val Thr
 130 135 140

Asn Tyr Ser Leu Thr Gly Cys Glu Gly Lys Pro Leu Pro Lys Asp Leu
 145 150 155 160

Thr Phe Val Ala Asp Pro Lys Ala Gly Ile Thr Ile Lys Asn Val Lys
 165 170 175

Arg Glu Tyr His Arg Leu Cys Leu His Cys Ser Ala Asn Gln Gly Gly
 180 185 190

Lys Ser Val Leu Ser Lys Lys Phe Thr Leu Lys Val Arg Ala Ala Ile
 195 200 205

Arg Ala Val Pro Val Val Ala Val Ser Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg
 210 215 220

Glu Gly Glu Glu Phe Ala Val Met Cys Leu Ile Lys Asp Val Ser Ser
 225 230 235 240

Ser Val Asp Ser Met Trp Ile Arg Glu Asn Ser Gln Thr Lys Ala Gln
 245 250 255

Val Lys Arg Asn Ser Trp His Gln Gly Asp Phe Asn Phe Leu Arg Gln
 260 265 270

Glu Arg Leu Thr Ile Ser Ser Ala Arg Val Asn Asp Ser Gly Val Phe
 275 280 285

Met Cys Tyr Ala Asn Asn Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr
 290 295 300

Leu Glu Val Val Asp Lys Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Met Met Asn
 305 310 315 320

Thr Thr Val Phe Val Asn Asp Gly Glu Asp Val Asp Leu Ile Val Glu
 325 330 335

Tyr Glu Ala Tyr Pro Lys Pro Glu His Arg Gln Trp Ile Tyr Met Asn
 340 345 350

Arg Thr Ala Thr Asp Lys Trp Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu
 355 360 365

Ser Asn Ile Arg Tyr Val Ser Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly
 370 375 380

Thr Glu Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Leu Val Ser Asn Ala Asp Val Asn
 385 390 395 400
 Ser Ser Val Thr Phe Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu
 405 410 415
 Thr His Asp Arg Leu Met Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly
 420 425 430
 Phe Pro Glu Pro Thr Ile Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln
 435 440 445
 Arg Cys Ser Val Pro Val Gly Pro Val Asp Val Gln Ile Gln Asn Ser
 450 455 460
 Ser Val Ser Pro Phe Gly Lys Leu Val Ile His Ser Ser Ile Asp Tyr
 465 470 475 480
 Ser Ala Phe Lys His Asn Gly Thr Val Glu Cys Arg Ala Tyr Asn Asp
 485 490 495
 Val Gly Lys Ser Ser Ala Phe Phe Asn Phe Ala Phe Lys Glu Gln Ile
 500 505 510
 His Ala His Thr Leu Phe Thr Pro Leu Leu Ile Gly Phe Val Ile Ala
 515 520 525
 Ala Gly Met Met Cys Ile Ile Val Met Ile Leu Thr Tyr Lys Tyr Leu
 530 535 540
 Gln Lys Pro Met Tyr Glu Val Gln Trp Lys Val Val Glu Glu Ile Asn
 545 550 555 560
 Gly Asn Asn Tyr Val Tyr Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asp His
 565 570 575
 Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asn Arg Leu Ser Phe Gly Lys Thr Leu Gly
 580 585 590
 Ala Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Tyr Gly Leu Ile
 595 600 605
 Lys Ser Asp Ala Ala Met Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Pro Ser
 610 615 620
 Ala His Leu Thr Glu Arg Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Val Leu
 625 630 635 640

Ser Tyr Leu Gly Asn His Met Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys
 645 650 655
 Thr Ile Gly Gly Pro Thr Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly
 660 665 670
 Asp Leu Leu Asn Phe Leu Arg Arg Lys Arg Asp Ser Phe Ile Cys Ser
 675 680 685
 Lys Gln Glu Asp His Ala Glu Ala Ala Leu Tyr Lys Asn Leu Leu His
 690 695 700
 Ser Lys Glu Ser Ser Cys Ser Asp Ser Thr Asn Glu Tyr Met Asp Met
 705 710 715 720
 Lys Pro Gly Val Ser Tyr Val Val Pro Thr Lys Ala Asp Lys Arg Arg
 725 730 735
 Ser Ala Arg Ile Gly Ser Tyr Ile Glu Arg Asp Val Thr Pro Ala Ile
 740 745 750
 Met Glu Asp Asp Glu Leu Ala Leu Asp Leu Glu Asp Leu Leu Ser Phe
 755 760 765
 Ser Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Ala Phe Leu Ala Ser Lys Asn Cys
 770 775 780
 Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Thr His Gly Arg
 785 790 795 800
 Ile Thr Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Lys Asn Asp
 805 810 815
 Ser Asn Tyr Val Val Lys Gly Asn Ala Arg Leu Pro Val Lys Trp Met
 820 825 830
 Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asn Cys Val Tyr Thr Phe Glu Ser Asp Val
 835 840 845
 Trp Ser Tyr Gly Ile Phe Leu Trp Glu Leu Phe Ser Leu Gly Ser Ser
 850 855 860
 Pro Tyr Pro Gly Met Pro Val Asp Ser Lys Phe Tyr Lys Met Ile Lys
 865 870 875 880
 Glu Gly Phe Arg Met Leu Ser Pro Glu His Ala Pro Ala Glu Met Tyr
 885 890 895

Asp Ile Met Lys Thr Cys Trp Asp Ala Asp Pro Leu Lys Arg Pro Thr
 900 905 910

Phe Lys Gln Ile Val Gln Leu Ile Glu Lys Gln Ile Ser Glu Ser Thr
 915 920 925

Asn His Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Asn Cys Ser Pro His Arg Glu Asn
 930 935 940

Pro Ala Val Asp His Ser Val Arg Ile Asn Ser Val Gly Ser Ser Ala
 945 950 955 960

Ser Ser Thr Gln Pro Leu Leu Val His Glu Asp Val
 965 970

<210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 3
 Pro Leu Leu Val His Glu Asp Val
 1 5

<210> 4
 <211> 936
 <212> ADN
 <213> Sus scrofa

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(936)

<400> 4
 atg gcc gcg ctg ctc ctg ggc gcg gtg atg ctg gtc ctt cag ctc cag 48
 Met Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ala Val Met Leu Val Leu Gln Leu Gln
 1 5 10 15

ctg gtg cct tgc cgc ccc gcc atg ccc ggg gcc ggg ccg agc cag cag 96
 Leu Val Pro Cys Arg Pro Ala Met Pro Gly Ala Gly Pro Ser Gln Gln
 20 25 30

gag ctt gtg cgg aaa gcg gcg acc ctc cag gat gag gtc cgg gac agc 144
 Glu Leu Val Arg Lys Ala Ala Thr Leu Gln Asp Glu Val Arg Asp Ser

35	40	45	
gcg gcc ccc aac ggc tcc gtc cag cag ctg ccg cag acc atc atc atc			192
Ala Ala Pro Asn Gly Ser Val Gln Gln Leu Pro Gln Thr Ile Ile Ile			
50	55	60	
ggc gtg cgc aag ggc ggg acc cgc gcg ctg ctg gag atg ctc agc ctg			240
Gly Val Arg Lys Gly Gly Thr Arg Ala Leu Leu Glu Met Leu Ser Leu			
65	70	75	80
cat ccc gac gtg gct gct gcg gag aac gag gtg cac ttc ttc gac tgg			288
His Pro Asp Val Ala Ala Ala Glu Asn Glu Val His Phe Phe Asp Trp			
85	90	95	
gag gag cat tac agc caa ggc ctg gac tgg tac ctc agc cag atg ccc			336
Glu Glu His Tyr Ser Gln Gly Leu Asp Trp Tyr Leu Ser Gln Met Pro			
100	105	110	
ttc tcc tac ccg cac cag ctc acg gtt gaa aag acc ccc gcg tac ttc			384
Phe Ser Tyr Pro His Gln Leu Thr Val Glu Lys Thr Pro Ala Tyr Phe			
115	120	125	
acg tcg ccc aaa gtg cct gag cgg gtc cac cgc atg aac ccg tcc atc			432
Thr Ser Pro Lys Val Pro Glu Arg Val His Arg Met Asn Pro Ser Ile			
130	135	140	
cgg ctg ctg ctc atc ctg cgg gac ccg tcg gag cgc gtg ctg tcc gac			480
Arg Leu Leu Leu Ile Leu Arg Asp Pro Ser Glu Arg Val Leu Ser Asp			
145	150	155	160
tac acc caa gtg ttc tac aac cac gtg cag aag cac aag ccc tac ccg			528
Tyr Thr Gln Val Phe Tyr Asn His Val Gln Lys His Lys Pro Tyr Pro			
165	170	175	
tcc atc gag gag ttc ctg gtg cgc gac ggc cgc ctc aac gtg gac tac			576
Ser Ile Glu Glu Phe Leu Val Arg Asp Gly Arg Leu Asn Val Asp Tyr			
180	185	190	
aag gcc ctc aac cga agc ctg tac cac gtg cac atg cag aac tgg ctg			624
Lys Ala Leu Asn Arg Ser Leu Tyr His Val His Met Gln Asn Trp Leu			
195	200	205	
cgc ttc ttc ccg ctg cgc cgc atc cac atc gtg gat ggc gac cgc ctc			672
Arg Phe Phe Pro Leu Arg Arg Ile His Ile Val Asp Gly Asp Arg Leu			
210	215	220	
atc agg gac cct ttt cct gag atc cag aag gtc gag agg ttc ctg atg			720
Ile Arg Asp Pro Phe Pro Glu Ile Gln Lys Val Glu Arg Phe Leu Met			

225 230 235 240
 ctg tcg ccg cag atc aac gcc tgc aac ttc tac ttt aac aaa acc aag 768
 Leu Ser Pro Gln Ile Asn Ala Ser Asn Phe Tyr Phe Asn Lys Thr Lys
 245 250 255
 ggc ttt tac tgc ctg cgg gac ggc ggc cgg gac cgc tgc tta cat gag 816
 Gly Phe Tyr Cys Leu Arg Asp Gly Gly Arg Asp Arg Cys Leu His Glu
 260 265 270
 tcc aaa ggc cgg gcg cac ccc cag atc gac ccc aaa ctc ctc aat aaa 864
 Ser Lys Gly Arg Ala His Pro Gln Ile Asp Pro Lys Leu Leu Asn Lys
 275 280 285
 ctg cac gaa tat ttt cat gag cca aat aag aaa ttt ttc gag ctt gtg 912
 Leu His Glu Tyr Phe His Glu Pro Asn Lys Lys Phe Phe Glu Leu Val
 290 295 300
 ggc aga aca ttt gac tgg cac taa 936
 Gly Arg Thr Phe Asp Trp His
 305 310

 <210> 5
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

 <400> 5
 Met Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ala Val Met Leu Val Leu Gln Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Val Pro Cys Arg Pro Ala Met Pro Gly Ala Gly Pro Ser Gln Gln
 20 25 30
 Glu Leu Val Arg Lys Ala Ala Thr Leu Gln Asp Glu Val Arg Asp Ser
 35 40 45
 Ala Ala Pro Asn Gly Ser Val Gln Gln Leu Pro Gln Thr Ile Ile Ile
 50 55 60
 Gly Val Arg Lys Gly Gly Thr Arg Ala Leu Leu Glu Met Leu Ser Leu
 65 70 75 80
 His Pro Asp Val Ala Ala Ala Glu Asn Glu Val His Phe Phe Asp Trp
 85 90 95
 Glu Glu His Tyr Ser Gln Gly Leu Asp Trp Tyr Leu Ser Gln Met Pro

100	105	110
Phe Ser Tyr Pro His Gln Leu Thr Val Glu Lys Thr Pro Ala Tyr Phe		
115	120	125
Thr Ser Pro Lys Val Pro Glu Arg Val His Arg Met Asn Pro Ser Ile		
130	135	140
Arg Leu Leu Leu Ile Leu Arg Asp Pro Ser Glu Arg Val Leu Ser Asp		
145	150	155
Tyr Thr Gln Val Phe Tyr Asn His Val Gln Lys His Lys Pro Tyr Pro		
165	170	175
Ser Ile Glu Glu Phe Leu Val Arg Asp Gly Arg Leu Asn Val Asp Tyr		
180	185	190
Lys Ala Leu Asn Arg Ser Leu Tyr His Val His Met Gln Asn Trp Leu		
195	200	205
Arg Phe Phe Pro Leu Arg Arg Ile His Ile Val Asp Gly Asp Arg Leu		
210	215	220
Ile Arg Asp Pro Phe Pro Glu Ile Gln Lys Val Glu Arg Phe Leu Met		
225	230	235
Leu Ser Pro Gln Ile Asn Ala Ser Asn Phe Tyr Phe Asn Lys Thr Lys		
245	250	255
Gly Phe Tyr Cys Leu Arg Asp Gly Gly Arg Asp Arg Cys Leu His Glu		
260	265	270
Ser Lys Gly Arg Ala His Pro Gln Ile Asp Pro Lys Leu Leu Asn Lys		
275	280	285
Leu His Glu Tyr Phe His Glu Pro Asn Lys Lys Phe Phe Glu Leu Val		
290	295	300
Gly Arg Thr Phe Asp Trp His		
305	310	

<210> 6

<211> 1236

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1236)

<400> 6

atg cgg cgg cgg cgc gct ggc agc agg acc atg gtt gag cgc gcc agc	48
Met Arg Arg Arg Arg Ala Gly Ser Arg Thr Met Val Glu Arg Ala Ser	
1 5 10 15	
aag ttc gtg ctg gtc gtg gcg ggc tgc gcg tgc ttc atg ctc atc ctc	96
Lys Phe Val Leu Val Val Ala Gly Ser Ala Cys Phe Met Leu Ile Leu	
20 25 30	
tac cag tac gcg ggc ccg ggg ctg agc ctg ggc gcg ccc ggc ggc cgc	144
Tyr Gln Tyr Ala Gly Pro Gly Leu Ser Leu Gly Ala Pro Gly Gly Arg	
35 40 45	
gcg ccg ccc gac gac ctg gac ctc ttc ccc acg ccc gac ccg cac tac	192
Ala Pro Pro Asp Asp Leu Asp Leu Phe Pro Thr Pro Asp Pro His Tyr	
50 55 60	
gag aag aag tac tac ttc ccg gtg cgc gag ctg gag cgc tgc ctg cac	240
Glu Lys Lys Tyr Tyr Phe Pro Val Arg Glu Leu Glu Arg Ser Leu His	
65 70 75 80	
ttc gac atg aag ggc gac gac gtg ata gtc ttc ttg cac atc cag aaa	288
Phe Asp Met Lys Gly Asp Asp Val Ile Val Phe Leu His Ile Gln Lys	
85 90 95	
acg ggc ggc acc acc ttc ggc cgt cac ctc gtg cag aac gtg cgc ctc	336
Thr Gly Gly Thr Thr Phe Gly Arg His Leu Val Gln Asn Val Arg Leu	
100 105 110	
gag gtg ccc tgc gac tgc cgg ccc ggc cag aag aag tgc acc tgc tac	384
Glu Val Pro Cys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Lys Lys Cys Thr Cys Tyr	
115 120 125	
cgg ccc aac cgc cgc gag acc tgg ctc ttc tcc cgc ttc tcc acg ggc	432
Arg Pro Asn Arg Arg Glu Thr Trp Leu Phe Ser Arg Phe Ser Thr Gly	
130 135 140	
tgg agc tgc gga ctg cac gcc gac tgg acc gag ctc acc aac tgc gtg	480
Trp Ser Cys Gly Leu His Ala Asp Trp Thr Glu Leu Thr Asn Cys Val	
145 150 155 160	
ccc ggc gtg ctg gac cgc cgc gac ccc gcc gcg ctg cgc acg ccc agg	528
Pro Gly Val Leu Asp Arg Arg Asp Pro Ala Ala Leu Arg Thr Pro Arg	
165 170 175	

aag ttc tac tac atc acc ctg ctg cga gac ccc gtg tcc cgc tac ctg 576
Lys Phe Tyr Tyr Ile Thr Leu Leu Arg Asp Pro Val Ser Arg Tyr Leu
180 185 190

agt gag tgg cgg cat gta cag cgg ggg gcc aca tgg aag acg tgc ctg 624
Ser Glu Trp Arg His Val Gln Arg Gly Ala Thr Trp Lys Thr Ser Leu
195 200 205

cac atg tgt gac ggg cgc acg ccc acc cct gag gag ctg cca ccc tgc 672
His Met Cys Asp Gly Arg Thr Pro Thr Pro Glu Glu Leu Pro Pro Cys
210 215 220

tac gag ggc acg gac tgg tgc ggc tgc aca ctg cag gag ttc atg gac 720
Tyr Glu Gly Thr Asp Trp Ser Gly Cys Thr Leu Gln Glu Phe Met Asp
225 230 235 240

tgc ccc tac aac ctg gcc aat aac cgc cag gtg cga atg ctg gcc gac 768
Cys Pro Tyr Asn Leu Ala Asn Asn Arg Gln Val Arg Met Leu Ala Asp
245 250 255

ctg agc ctg gtg ggc tgc tac aac ctg tcc ttc atc ccc gag ggc aag 816
Leu Ser Leu Val Gly Cys Tyr Asn Leu Ser Phe Ile Pro Glu Gly Lys
260 265 270

cgg tcc caa ctg ctg ctg gaa agc gcc aag aag aac ctg cgg ggc atg 864
Arg Ser Gln Leu Leu Leu Glu Ser Ala Lys Lys Asn Leu Arg Gly Met
275 280 285

gcc ttc ttc ggc ctg acc gag ttc cag cgc aag acg cag tac ctg ttc 912
Ala Phe Phe Gly Leu Thr Glu Phe Gln Arg Lys Thr Gln Tyr Leu Phe
290 295 300

gag cgg acg ttc aac ctc aag ttc atc cgg cct ttc atg cag tac aac 960
Glu Arg Thr Phe Asn Leu Lys Phe Ile Arg Pro Phe Met Gln Tyr Asn
305 310 315 320

agc acg cga gcg ggt ggc gtg gag gtg ggt gag gac acc atc cgg cgc 1008
Ser Thr Arg Ala Gly Gly Val Glu Val Gly Glu Asp Thr Ile Arg Arg
325 330 335

att gag gag ctc aac gac ctg gac atg cag ctg tac gac tac gcc agg 1056
Ile Glu Glu Leu Asn Asp Leu Asp Met Gln Leu Tyr Asp Tyr Ala Arg
340 345 350

gac ctc ttc cag cag cgc tat cag tac aag cgg cag ctg gag cgc cgg 1104
Asp Leu Phe Gln Gln Arg Tyr Gln Tyr Lys Arg Gln Leu Glu Arg Arg
355 360 365

cag cag cgc ctc cgg agc cgc gag gag cgc ctg ctg cac cgg gcc aag 1152
 Gln Gln Arg Leu Arg Ser Arg Glu Glu Arg Leu Leu His Arg Ala Lys
 370 375 380

gag gcg cca cct cgg ggg gac acc gag gag ccg ggc cga gtg ccc act 1200
 Glu Ala Pro Pro Arg Gly Asp Thr Glu Glu Pro Gly Arg Val Pro Thr
 385 390 395 400

gag gac tac atg agc cac atc atc gag aag tgg tag 1236
 Glu Asp Tyr Met Ser His Ile Ile Glu Lys Trp
 405 410

<210> 7
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 7
 Met Arg Arg Arg Arg Ala Gly Ser Arg Thr Met Val Glu Arg Ala Ser
 1 5 10 15

Lys Phe Val Leu Val Val Ala Gly Ser Ala Cys Phe Met Leu Ile Leu
 20 25 30

Tyr Gln Tyr Ala Gly Pro Gly Leu Ser Leu Gly Ala Pro Gly Gly Arg
 35 40 45

Ala Pro Pro Asp Asp Leu Asp Leu Phe Pro Thr Pro Asp Pro His Tyr
 50 55 60

Glu Lys Lys Tyr Tyr Phe Pro Val Arg Glu Leu Glu Arg Ser Leu His
 65 70 75 80

Phe Asp Met Lys Gly Asp Asp Val Ile Val Phe Leu His Ile Gln Lys
 85 90 95

Thr Gly Gly Thr Thr Phe Gly Arg His Leu Val Gln Asn Val Arg Leu
 100 105 110

Glu Val Pro Cys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Lys Lys Cys Thr Cys Tyr
 115 120 125

Arg Pro Asn Arg Arg Glu Thr Trp Leu Phe Ser Arg Phe Ser Thr Gly
 130 135 140

Trp Ser Cys Gly Leu His Ala Asp Trp Thr Glu Leu Thr Asn Cys Val

145 150 155 160
 Pro Gly Val Leu Asp Arg Arg Asp Pro Ala Ala Leu Arg Thr Pro Arg
 165 170 175
 Lys Phe Tyr Tyr Ile Thr Leu Leu Arg Asp Pro Val Ser Arg Tyr Leu
 180 185 190
 Ser Glu Trp Arg His Val Gln Arg Gly Ala Thr Trp Lys Thr Ser Leu
 195 200 205
 His Met Cys Asp Gly Arg Thr Pro Thr Pro Glu Glu Leu Pro Pro Cys
 210 215 220
 Tyr Glu Gly Thr Asp Trp Ser Gly Cys Thr Leu Gln Glu Phe Met Asp
 225 230 235 240
 Cys Pro Tyr Asn Leu Ala Asn Asn Arg Gln Val Arg Met Leu Ala Asp
 245 250 255
 Leu Ser Leu Val Gly Cys Tyr Asn Leu Ser Phe Ile Pro Glu Gly Lys
 260 265 270
 Arg Ser Gln Leu Leu Leu Glu Ser Ala Lys Lys Asn Leu Arg Gly Met
 275 280 285
 Ala Phe Phe Gly Leu Thr Glu Phe Gln Arg Lys Thr Gln Tyr Leu Phe
 290 295 300
 Glu Arg Thr Phe Asn Leu Lys Phe Ile Arg Pro Phe Met Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Arg Ala Gly Gly Val Glu Val Gly Glu Asp Thr Ile Arg Arg
 325 330 335
 Ile Glu Glu Leu Asn Asp Leu Asp Met Gln Leu Tyr Asp Tyr Ala Arg
 340 345 350
 Asp Leu Phe Gln Gln Arg Tyr Gln Tyr Lys Arg Gln Leu Glu Arg Arg
 355 360 365
 Gln Gln Arg Leu Arg Ser Arg Glu Glu Arg Leu Leu His Arg Ala Lys
 370 375 380
 Glu Ala Pro Pro Arg Gly Asp Thr Glu Glu Pro Gly Arg Val Pro Thr
 385 390 395 400
 Glu Asp Tyr Met Ser His Ile Ile Glu Lys Trp

405

410

<210> 8
<211> 39
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 8
gaccacgcgt atcgatgtcg actttttttt ttttttttv

39

<210> 9
<211> 33
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 9
ggaattcctc gagagcagga acgtggaaag gag

33

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 10
gaccacgcgt atcgatgtcg ac

22

<210> 11
<211> 17
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 11
gcagcagcca cgtcggg

17

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 12
tcagtgygag tcraatgttc

20

<210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Sus scrofa

<400> 13
 cgnggaccgc ctnatcag

18

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Sus scrofa

<400> 14
 tcagtgyccag tcraatgttc

20

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sus scrofa

<400> 15
 attctagagg ccgaggcggc cgacatg

27

<210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Sus scrofa

<400> 16
 gcacccccag atcgacccc

19

<210> 17
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sus scrofa

<400> 17
 caaactcctc aataaactgc acg

23

<210> 18
 <211> 48

<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 18
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc agcatggccg cgctgctc

48

<210> 19
<211> 52
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 19
gggaccactt tgtacaagaa agctggggtt agtgccagtc aaatgttctg cc

52

<210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 20
agatgactgg tcgggctgc

19

<210> 21
<211> 23
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 21
caatgatrtg gctcatgtag tcc

23

<210> 22
<211> 25
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 22
atgggtgagc ggcagcaa gttcg

25

<210> 23
<211> 24
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 23
ggttattggc caggtttag gggc

24

<210> 24
<211> 28
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 24
attctagagg ccgaggcggc cgacatgt

28

<210> 25
<211> 18
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 25
ggacctcttc cagcagcg

18

<210> 26
<211> 21
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 26
gctatcagta caagcggcag c

21

<210> 27
<211> 16
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 27
ccaggctcag ccccg

16

<210> 28
<211> 39
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 28
gaccacgcgt atcgatgtcg actttttttt tttttttv

39

<210> 29
<211> 23
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 29
ggcaatgtcg acctccctac aac

23

<210> 30
<211> 17
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 30
tcagccccgg gcccgcg

17

<210> 31
<211> 23
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 31
ctccctacaa cccgaattcc tac

23

<210> 32
<211> 19
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 32
gccccggtac tggtagagg

19

<210> 33
<211> 56
<212> ADN
<213> Sus scrofa

<400> 33
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt aggacaatgg tgacacatgc ggcggc

56

<210> 34
<211> 55



<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 34

ggggaccact ttgtacaaga aagctggggtc ctaccacttc tcgatgatgt ggctc

55

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

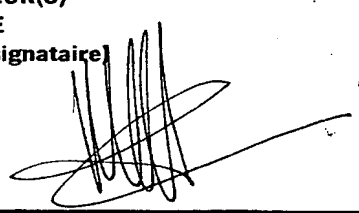
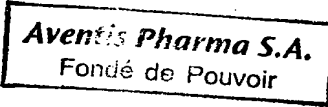
DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		FRAV2003/0009
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03 04671
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PROCÉDE D'OBTENTION DE LIGNEES DE MASTOCYTES A PARTIR DE TISSUS DE PORCS ET PROCÉDE DE PRODUCTION DE MOLECULES DE TYPE HEPARINE.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
AVENTIS PHARMA S.A. : 20 avenue Raymond Aron - 92160 ANTONY (FRANCE)		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	GUILLAUME
	Prénoms	Jean-Marc
Adresse	Rue	22 rue Paul Bert
	Code postal et ville	75 011 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	PEREZ
	Prénoms	Sandrine
Adresse	Rue	11 rue Emile Goeury
	Code postal et ville	94 140 ALFORTVILLE
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	DITTRICH
	Prénoms	Werner
Adresse	Rue	Voltastr. 76
	Code postal et ville	60 486 FRANKFURT
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
22 septembre 2003		
BOUVET Philippe		



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

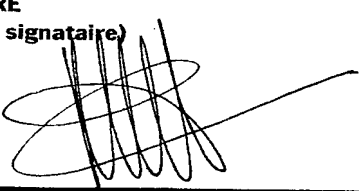
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.. / 2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		FRAV2003/0009
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03 04671
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PROCEDE D'OBTENTION DE LIGNEES DE MASTOCYTES A PARTIR DE TISSUS DE PORCS ET PROCEDE DE PRODUCTION DE MOLECULES DE TYPE HEPARINE.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
AVENTIS PHARMA S.A. : 20 avenue Raymond Aron - 92160 ANTONY (FRANCE)		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	ANDREONI
	Prénoms	Christine Michelle Pierrette
Adresse	Rue	6 rue des Fusains
	Code postal et ville	3 8 2 8 0 VILLETTE D'ANTHON
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	PAILLOT
	Prénoms	Romain
Adresse	Rue	23 rue Saint Maurice
	Code postal et ville	6 9 0 0 8 LYON
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
22 septembre 2003		 BOUVET Philippe
		Aven... Pharma S.A. Fo... de Pouvoir

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)